Über proteolytische Fermente in menschlichen bösartigen Geschwülsten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der Philosophischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

FRITZ WERR

aus Frankfurt/Oder

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 1933
Tag der Promotion: 27. Juli 1934

Druck: Doktordruck — Graphisches Institut Paul Funk,
Berlin SW 68, Friedrichstr. 231.

403

Referenten: Professor Dr. W. Schlenk
Professor Dr. M. Bodenstein

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550815_0143

Inhaltsübersicht.

I. Einleitung 109

II. Methodik 115

1. Das Enzymmaterial und seine Gewinnung 115
2. Bestimmungsmethoden 118

a) Proteinasen 118
b) Ereptase 124

3. Reinigungsmethoden und Konzentrationsbestimmung 125

III. Qualitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen 126

1. Versuche zur Kinetik der Proteinasen 126

a) Beziehung zwischen Umsatz und Zeit 126
b) Beziehung zwischen Umsatz und Fermentkonzentration 129

2. Optimum-p_H-Kurven 140

a) Substrat: Casein 140
b) Substrat: Gelatine 147
c) Substrat: Serumalbumin 149
d) Substrat: Organeiweiß 149
e) Substrat: Eigeneiweiß der Extrakte 150
f) Substrat: Edestin 151

3. Aktivierungsverhalten 152
a) Abhängigkeit der Aktivierung vom Substrat 152
b) Abhängigkeit der Aktivierung von den Versuchsbedingungen 157
1. Aktivatorkonzentration 157
2. Optimum-p_H-Kurven 159
3. Inkubationszeit 159
4. Fermentkonzentration 159
4. Verhalten bei adsorptiver Abtrennung und Reinigung . . . 181
a) Allgemeines Adsorptionsverhalten 181
b) Optimum-p_H-Kurven 182
c) Aktivierungsverhalten 183
IV. Quantitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen 184
V. Qualitativer und quantitativer Vergleich von Tumorereptasen mit Organereptasen 202
VI. Versuchsprotokolle 132, 163, 204
VII. Besprechung und Zusammenfassung 209
Literatur 216

I. Einleitung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung proteolytischer Fermente normaler tierischer und menschlicher Gewebe sowie bösartiger menschlicher Geschwülste. Die Untersuchung hat das Ziel, die eiweißspaltenden Fermente der normalen Gewebe mit denen der Tumoren sowohl qualitativ wie quantitativ zu vergleichen, um festzustellen, ob die Eigenart der Tumorzelle, insbesondere ihr fortschreitendes, andere Gewebe zerstörendes Wachstum in Beziehung zur Art und Konzentration der in ihr vorhandenen proteolytischen Fermente zu bringen ist.

Die wesentlichsten Fortschritte in der Aufklärung des Stoffwechsels der Geschwulstzelle sind bisher auf dem Gebiete des oxydativen Abbaues erzielt worden. Es ist bekannt, daß es *Warburg* (1)* gelang, nachzuweisen, daß die Geschwulstzelle im Gegensatz zur normalen Gewebszelle ihren Energiebedarf überwiegend mittels anaerober Vergärung von Kohlenhydraten und nur zu geringem Teil mittels des üblichen oxydativen Abbaues deckt.

Neben diesen Besonderheiten des Kohlenhydratstoffwechsels und somit des Energiebezugs nimmt man heute noch auf Grund der älteren Unter-

* Die Literaturzusammenstellung befindet sich am Schluß der fünften Mitteilung, siehe daselbst auch die zusammenfassende Besprechung.

suchungen von *Blumenthal* (2) und Mitarbeitern sowie *Neuberg* (3) und Mitarbeitern an, daß die charakteristischen Eigenschaften des Tumors hinsichtlich Wachstum und Zerfall in Beziehungen zu Eigentümlichkeiten proteolytischer Vorgänge stehen.

Diese Vorstellung ist neuerdings wieder dadurch in den Vordergrund getreten, daß *Waldschmidt-Leitz* und *Schäffner* (4) auf Grund ihrer experimentellen Arbeiten eine Theorie (s. unten) aufgestellt haben, die eine Aktivierung proteolytischer Vorgänge in Tumoren mit ihrem geänderten Kohlenhydratstoffwechsel verknüpft.

Die Bedeutung dieser Erscheinungen gab die Veranlassung für diese Arbeit, die proteolytischen Fermente in Tumoren, insbesondere die Proteinasen eingehend mit denen normaler Gewebe zu vergleichen. Es sei vorausgenommen, daß die Ergebnisse gegen eine Sonderstellung der Tumorzelle bei proteolytischen Vorgängen im Vergleich zu normalen Zellen sprechen.

Die Untersuchungen gehen von dem heutigen Stand der Kenntnisse der proteolytischen Enzyme in tierischen Geweben aus.

Man unterscheidet — unter Ausschluß der Verdauungsdrüsen — zwei Hauptgruppen: *die „Proteinasen"*, die genuines Eiweiß und *die „Ereptasen"*, die Eiweißspaltstücke angreifen. Von den Proteinasen scheint das bei schwach saurer Reaktion (p_H 4 bis 5) optimal wirkende „Kathepsin", das etwa dem in pflanzlichen Zellen wirksamen Papain entspricht, das wesentliche, in Menge überwiegende und wohl in allen tierischen Zellen vorhandene Ferment zu sein. Es ist mit der sogenannten β-Protease *Hedin*s (5) identisch. Mit diesem Ferment beschäftigen sich im wesentlichen die Untersuchungen dieser Arbeit. Daneben hatte *Hedin* in Milzextrakten auch im alkalischen Gebiet (bei p_H 8) einen Abbau von Eiweiß beobachtet und diese Wirkung einem tryptischen Ferment, der sogenannten α-Protease, zugeschrieben. *E. Waldschmidt-Leitz* und *W. Deutsch* (6) glaubten später, den Nachweis führen zu können, daß die tryptische Wirkung nur vorgetäuscht sei. Und zwar sollte durch das Zusammenwirken der schwachen Restaktivität des Kathepsins mit den bei etwa p_H 8 optimal wirkenden Ereptasen das Maximum im alkalischen Teil der Spaltkurven hervorrufen. *H. Kleinmann* u. *K. G. Stern* (7) glaubten unter Heranziehung der nephelometrischen Untersuchungsform sich dieser Anschauung anschließen zu können, doch gelang es schließlich *Kleinmann* und Mitarbeitern in einer Reihe von Untersuchungen die Verhältnisse wie folgt aufzuklären (s. hierzu auch *P. Rona* und *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **241**, Heft **4/6**, 1931):

Nachdem *R. Willstätter* und *E. Bamann* (8) die älteren Beobachtungen über das Vorkommen von Tryptase in weißen Blutzellen bestätigt hatten [s. hierzu auch *Husfeld* (9) sowie *K. G. Stern* (10)] und *S. G. Hedin* (11) neuerlich auf die Existenz der Protease hingewiesen hatte, war an der Existenz eines tryptisch wirksamen Fermentkomplexes in weißen Blutzellen (Myelocyten) nicht mehr zu zweifeln. In einer noch nicht veröffentlichten Untersuchung konnten nun *H. Kleinmann* und *G. Scharr* auch mit der nephelometrischen Methode nachweisen, daß in weißen Blutzellen wahres Trypsin in erheblicher Menge vorhanden ist. Nach weiteren Untersuchungen von *Kleinmann* (die folgend in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden), ist in parenchymatösen Geweben echte Tryptase vorhanden, die aber oft nur in geringer Menge auftritt, so daß sie sich dem methodischen Nachweis entzieht. Die Größenordnungen schwanken je nach dem, ob ein

Extrakt nativ verhältnismäßig fermentarm oder -reich ist. Jedenfalls liegen die Werte für Organe und einzelne Tumoren über denjenigen Werten die bei der Zugrundelegung des Tryptasegehalts des Blutes und Blutgehalts des betreffenden Gewebes in diesem zu erwarten gewesen wären. Ob es sich hierbei um eine tatsächlich im Zellinnern gebildete Proteinase oder um Enzymmengen handelt, die durch Zerfall von Myelocyten im Gewebe angetroffen werden, ist heute noch nicht zu entscheiden.

Außer den beiden Proteinasen finden sich nun in der Zelle Enzyme, die auf Eiweißbruchstücke eingestellt sind und deren eingehende Erforschung wir den Arbeiten von *E. Waldschmidt-Leitz* und Mitarbeitern [siehe hierzu auch (12), (13)]. sowie *W. Grassmann* und Mitarbeitern verdanken (s. Zeitschr. f. physiol. Chem.). Nach diesen haben wir zu unterscheiden: Dipeptidasen und Polypeptidasen. Von diesen greift die Aminopolypeptidase, vergesellschaftet mit der Dipeptidase, höhere Peptide von der Seite der freien Aminosäuren aus an. Von der Carboxylseite aus wirksam ist die Carboxypolypeptidase, die das Kathepsin begleiten und wie dieses durch Komplexbildner (Schwefelwasserstoff, Cyanwasserstoff) aktivierbar sein soll.

Die vorliegende Untersuchung ist auf das Kathepsin, das Trypsin und die Dipeptidase in Normal- und Tumorgeweben beschränkt.

Die Fermente wurden zunächst in qualitativer Hinsicht untersucht und mit den entsprechenden Fermenten aus tierischen und menschlichen Organen und Geweben verglichen. Zum Vergleich mit Fermenten in Tumorextrakten dienten Extrakte aus Rindermilz, menschlichen parenchymatösen Geweben (Milz, Leber, Niere) und menschlichen nichtparenchymatösen Geweben (Gehirn, Muskulatur, Haut). Die verglichenen Fermente, d. h. im wesentlichen Kathepsin, wurden hinsichtlich ihres kinetischen Verhaltens geprüft. Des weiteren wurde die Angreifbarkeit verschiedener Substrate untersucht; der fermentativen Einwirkung wurden Casein, Gelatine, Edestin, Serumalbumin, Eiweiß aus menschlichen Organen, sowie das Eigeneiweiß der Fermentextrakte selbst ausgesetzt. Aktivitäts-p_H-Kurven wurden angelegt, das Verhalten des Ferments bei fortschreitender Reinigung wurde studiert und besonders eingehend das Verhalten gegen Aktivatoren untersucht.

Niemals konnte in qualitativer Hinsicht ein Unterschied zwischen dem Kathepsin der Tumoren (das gleiche gilt von Trypsin und Dipeptidase) und dem normaler Gewebe beobachtet werden.

Nunmehr wurde versucht, auch in quantitativer Hinsicht den Fermentgehalt der Tumoren mit dem normaler Gewebe in Vergleich zu bringen. Für diese Untersuchung war das vorausgegangene Studium des Aktivierungsverhaltens unerläßlich. Beruht doch die Anschauung von *E. Waldschmidt-Leitz* und *A. Schäffner* (4) gerade auf der Beeinflussung des Verhältnisses der in den Zellen unaktiviert und aktiviert vorhandenen Fermentmengen durch die in den Tumorzellen anormalen oxydativen Stoffwechselvorgänge.

Daher sei auf das Problem der Aktivierung tierischer Proteasen im folgenden kurz eingegangen.

Nachdem *R. Willstätter* und *W. Grassmann* (15) die älteren Befunde von *Vines* (16) und *L. B. Mendel* und *A. F. Blood* (17) über die Aktivierbarkeit des pflanzlichen Papains mittels Blausäure bestätigt und vertieft hatten, haben *E. Waldschmidt-Leitz* und Mitarbeiter (18) gezeigt, daß auch das tierische Kathepsin, ebenso wie die Hefeproteinase [*W. Grassmann* und *H. Dyckerhoff* (**22**)] durch Hilfskörper aktiviert werden kann. *H. Kleinmann* und *K. G. Stern* (7) prüften das Aktivierungsverhalten der Milzextrakte in höherem Reinheitsgrad und fanden, daß sich hierbei das Kathepsin nicht mehr durch Cyanwasserstoff, sondern nur noch durch Schwefelwasserstoff gegen Gelatine aktivieren läßt. Während aus den damaligen Versuchen auch bei Casein als Substrat auf Grund ganz kleiner Spaltungszunahmen eine Aktivierbarkeit des Ferments angenommen wurde, ist nach den Erfahrungen dieser Arbeit eine eindeutige Aktivierbarkeit nur bei Gelatine festzustellen. Des weiteren haben *E. Waldschmidt-Leitz* und Mitarbeiter (24) für tierische Gewebe bei der Autolyse und *O. Ambros* und *A. Harteneck* (21) sowie *W. Grassmann* und *H. Dyckerhoff* (19) (22) für pflanzliche Gewebe über das Vorkommen eines natürlichen Aktivators der Gewebsproteinasewirkung berichtet. Den Forschern ist es gelungen, die von ihnen gefundenen Aktivatoren („Phytokinase" bzw. „Zookinase") mit dem Tripeptid Glutathion zu identifizieren (23) (24). Auf der anderen Seite gibt es nach *W. Grassmann* im Pflanzenreich sicher auch Fälle natürlicher Aktivierung, die mit Glutathion nichts zu tun haben (23).

Bezüglich der Tumoren haben nun *E. Waldschmidt-Leitz* und *A. Schäffner* (4) dargestellt, daß nicht allein bei der Autolyse, sondern auch bei der Entstehung und dem Wachstum bösartiger Geschwülste die Aktivierung des Kathepsins durch Glutathion eine wichtige Rolle spiele. In Verbindung mit dem Befund von *W. Grassmann* [(23) (25)], daß nur in der reduzierten Form vorliegendes Glutathion als Aktivator der Proteolyse zu wirken vermag, hat nun *E. Waldschmidt-Leitz* die Anschauung entwickelt, daß zwischen dem Sauerstoffmangel und der gesteigerten Proteolyse in Tumoren ein innerer Zusammenhang bestehe. In der normalen Gewebszelle, die reichlich mit Sauerstoff versorgt ist, ist das Gleichgewicht zwischen oxydierter und reduzierter Form des Tripeptids stark zu Ungunsten des reduzierten Körpers verschoben.

Beim Absterben der Gewebe, oder allgemeiner bei Sauerstoffmangel, wie er unter anderem in Tumoren auftritt, verschiebt sich das natürliche Gleichgewicht zwischen den beiden Formen zugunsten der reduzierten, also des Aktivators. Auch *F. Demuth* und *I. v. Riesen* (26) berichten über kochbeständige Aktivatoren der Proteolyse in Sarkomen. Weiter dürfte zu dieser Verschiebung noch die Säuerung des Tumorgewebes infolge der Milchsäureproduktion beitragen, da die reduzierte Form des Glutathions im sauren Gebiet beständiger ist als die oxydierte.

L. Németh und *L. Karczag* und *L. Németh* (27) wollen einen fördernden Einfluß von Blausäure auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Carcinomen beobachtet haben.

Die Vorstellungen von *Waldschmidt-Leitz* wurden nun in dieser Arbeit zu prüfen gesucht, derart, daß der Fermentgehalt von Tumorextrakten sowohl unaktiviert wie aktiviert ausgewertet und in Vergleich zu den entsprechenden Werten von Normalgeweben gesetzt wurde.

Wäre die Tumorzelle durch besondere Aktivierungskörper ausgezeichnet und wäre ihr Wachstum durch einen Reichtum an aktivem Ferment in Beziehung zu bringen, so müßte sich auch in den Extrakten entweder eine auffallende Menge proteolytischen Ferments nachweisen lassen, oder es müßte zum mindesten das Verhältnis des aktivierten zum unaktivierten Fermentanteils ganz zu ungunsten des letzteren verschoben sein. Und bei der außerordentlichen physiologischen Leistung der Tumorzelle müßten Besonderheiten des Fermentgehalts, wenn sie als Ursache der Leistung anzusehen wären, auch auffallend und überzeugend in Erscheinung treten.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben nun, daß Extrakte aus Tumoren sich auch quantitativ in keiner Weise von solchen aus normalen Geweben unterscheiden. Tumorextrakte sind ärmer an eiweißspaltenden Fermenten als die normaler parenchymatöser Organe. Ihr Fermentgehalt ordnet sich zwischen dem dieser Organe und demjenigen nichtparenchymatöser Gewebe ein und entspricht somit dem morphologischen Zellgehalt der extrahierten Gewebe. Selbstverständlich schwanken die Fermentmengen der verschiedenen Extrakte. Aber selbst bei Schwankungen um eine Zehnerpotenz lassen sich die Grenzen der Fermentkonzentration der verschiedenen Gewebsarten umreißen und die Unterschiede in den verschiedenen Typen sind so groß, daß mit Sicherheit eine Reihenfolge in den Fermentkonzentrationen der Gewebe aufzustellen ist.

Selbstverständlich ist, daß alle Angaben sich auf Glycerinextrakte beziehen und daß in der nativen Zelle andere Zustände herrschen können wie in dem bereits ein Kunstprodukt darstellenden Extrakt. So können wohl Fermentbeeinflussungen durch Aziditätsänderungen in der Zelle (Säuerung im Carcinomgewebe) denkbar sein. Aber von den Verhältnissen in der lebenden Zelle wissen wir nichts und müssen uns darauf beschränken, nur das Extraktmaterial zu vergleichen. Da dieses aber gleichartig aus den verglichenen Geweben gewonnen wird, so gibt es doch eine Vergleichsgrundlage, und seine Untersuchung ist zum mindesten bisher der einzige Weg, um zu Aussagen zu gelangen.

Ist im vorangehenden im wesentlichen über den Gesamtgehalt der Zelle an Proteinasen gesprochen worden, so konnten auch hinsichtlich des Verhältnisses aktiviertes Ferment zu unaktiviertem in Tumorextrakten keine anderen Verhältnisse gefunden werden als in Extrakten normaler Gewebe, die den Tumorextrakten hinsichtlich der Fermentkonzentration entsprechen.

Dagegen konnte gezeigt werden, daß der Begriff der Aktivierung für die vorliegenden Versuche nur bei dem Substrat Gelatine anzuwenden ist. Weder mit Casein noch mit irgendeinem anderen der angewandten Substrate einschließlich dem Eiweiß aus menschlichen Organen und dem Eigeneiweiß der Fermentextrakte selbst war eine Wirkung der Aktivatoren Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff nachzuweisen.

Da nach den Angaben von *K. G. Stern* (28) sowie *L. Michaelis* und *K. G. Stern* (29) Metalle und Metallkomplexe (bei Anwendung von Fermentextrakteigeneiweiß als Substrat) fördern bzw. in höherer Konzentration die Proteolyse hemmen sollen, wäre immerhin eine Aktivierung durch Schwefelwasserstoff infolge Entfernung hemmender Metallkonzentrationen gegen Eigeneiweiß zu erwarten gewesen. Doch konnte eine derartige Wirkung nicht beobachtet werden.

Somit scheint eine Aktivierung des Ferments gegen das Zelleiweiß, worauf sich die Theorie von *Waldschmidt-Leitz* stützt, nicht einzutreten, sofern nicht noch nachgewiesen werden kann, daß die Zelle ihrer Proteinase Substrate bietet, gegen die eine Aktivierung überhaupt erfolgen kann.

Aus dem Beobachtungsmaterial, das zurzeit vorliegt, sowie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist nicht auf Aktivierungsvorgänge durch HS- oder HCN-Gruppen innerhalb der Zelle zu schließen.

Es zeigte sich also, daß die Proteasen der Tumoren sich in jeder Hinsicht vollständig gleichartig verhalten, wie diejenigen normaler Gewebe, über deren Unspezifität gegen Casein, was das Kathepsin anbetrifft, *Utkina-Ljubowzowa* und *Steppuhn* (30) berichten konnten.

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden größtenteils mit Hilfe von Mikromethoden durchgeführt, hauptsächlich mit Hilfe der Nephelometrie (31), mittels der die Analyse einer Reihe von Eiweißkörpern bereits ausgearbeitet worden ist. Als wesentlicher Vorteil der nephelometrischen Methode wird angesehen, daß ausschließlich unabgebautes Eiweiß gemessen wird, während ältere Methoden (z. B. *Waldschmidt-Leitz*), die Aminostickstoff usw. bestimmen, die Abbauprodukte messen und somit Nebenreaktionen (Ereptasewirkung) miterfassen. Weiter gestatten die nephelometrischen Methoden die Anwendung kleinster Materialmengen, wie sie bei der Untersuchung von Tumoren meistens vorliegen und auf Grund des schnellen und

sauberen Arbeitens die Durchführung ausgedehnter Reihenversuche. Die Nephelometrie wurde somit zur notwendigen Grundlage der vorliegenden Untersuchungen.

II. Methodik.

1. Das Enzymmaterial und seine Gewinnung.

Allgemeine Vorschriften zur Herstellung von Glycerinextrakten.

Von nahezu allen für die folgenden Versuche verwandten Geweben wurden fermenthaltige Extrakte vorzugsweise derart hergestellt, daß die Gewebe mit schwach essigsaurem Glycerin extrahiert wurden.

Von *Hedin* (5) (32) ist zwar angegeben worden, daß bei saurer Extraktion nicht alle Fermente dem Gewebe entzogen werden und daß z. B. Tryptase aus dem Gewebe hierbei nur zu geringem Teil entfernt wird, doch konnten wir uns hiervon nicht überzeugen. Einmal nämlich zeigten Versuche mit schwach alkalischen Extrakten aus Tumoren die gleichen p_H-Optimumkurven wie Versuche mit schwach sauren Extrakten (s. diese). Dann aber hat der eine von uns in einer zur gleichen Zeit durchgeführten Arbeit über die Fermente der Lymphocyten sich eingehend davon überzeugt, daß die bei alkalischer Reaktion mit Glycerin aus dem Gewebe gezogenen Fermente die nämlichen sind, wie die bei saurer Reaktion extrahierten. Dieser Punkt ist bei der genannten Arbeit ausführlich behandelt worden, und es muß auf dieselbe verwiesen werden (s. *P. Rona* und *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **241** Heft 4/6, 1931.)

Schließlich wird auch in einer weiteren Arbeit über Leucocytenfermente gezeigt werden, daß ein sicher tryptischer Komplex bei saurer Reaktion mit Glycerin gut extrahierbar war.

Da die geringe Menge Tumormaterial, die zur Verfügung stand, möglichst gut ausgenutzt werden sollte, wurde das Material auch bei der Glycerinextraktion nur einige Male geteilt und getrennt für saure wie für alkalische Extraktion verwandt. Da die alkalischen Extrakte äußerst schlecht filtrierten und viel Verlust bedingten, wurde auf ihre ständige Bereitung verzichtet und unter Benutzung der bei den verwiesenen Arbeiten erhaltenen Ergebnisse mit sauren, gut filtrierenden Extrakten gearbeitet.

Nun ist aber immerhin der Einwand möglich, daß sich bei der Extraktion mit *Glycerin* nach *Waldschmidt-Leitz* (6) zu den *wässerigen* Extraktionsmethoden nach *Hedin* (32) quantitativ gegensätzliche Unterschiede ergeben, derart, daß das katheptische Ferment besser oder schlechter durch die eine Methode extrahierbar ist als durch die andere. Es wurde daher eine Reihe von Versuchen auch mit den von *Hedin* angegebenen Extraktionsverfahren angestellt.

Es zeigte sich, daß das Verhalten der Fermente kein regelmäßiges war und die Fermentmengen in den verschiedenen Extrakten stark wechseln.

Daß die Angaben von *Hedin* nicht überall bestätigt werden konnten, liegt wohl an der Anwendung verschiedener Bestimmungsmethoden. *Hedin* bestimmte seine Fermentmengen durch Messung des nicht koagulierbaren Eiweißes nach *Kjeldahl*. Er bestimmte also Spaltprodukte der in Lösung gegangenen Eiweißstoffe. Hierdurch erfaßte er auf alkalischem Gebiete stets Mischungen von Tryptase und Ereptase zur Analyse. Aus diesem Grunde sind die Bestimmungen nach Spaltprodukten für die Proteinasenuntersuchungen abzulehnen.

Die hier angegebenen Methoden bestimmen das unangegriffene Substrat und messen daher allein die Wirkung von Proteinasen.

Des weiteren muß aber gegen die Methode der wässerigen Extraktion gesagt werden, daß sie leicht bakteriell zersetzliche Auszüge liefert. Während die saure Extraktion nach *Hedin* noch verhältnismäßig schnell verläuft, dauert die alkalische Extraktionsmethode längere Zeit und liefert trotz reichlicher Toluolanwendung häufig faulige oder bakteriell verunreinigte Extrakte. Da nun die wässerige Extraktion gegenüber derjenigen mit Glycerin somit Nachteile aber keine Vorteile aufwies, wurde in der folgenden Arbeit im Prinzip die Glycerinextraktion beibehalten (*s.* hierzu auch *P. Rona* und *H. Kleinmann*, l. c. S. 115).

Die Gewebe wurden stets so frisch als irgend möglich verwandt. Carcinome wurden stets unmittelbar nach der Operation verarbeitet. Es wurden nur unzerfallene bakteriell nicht verunreinigte Tumoren angewandt. Deshalb wurde auch möglichst mit circumscripten Mammacarcinomen gearbeitet.

Wo wir Magen- oder Organcarcinome verwandten, wurde der äußere eventuell bakteriell infizierte Teil des Gewebes fortgeschnitten und nur die saubere, reine zentrale Tumormasse benutzt. Bei den nach der Obduktion gewonnenen Tumoren, sowie bei der Gewinnung von Organfermenten wurde darauf gesehen, daß Material schon wenige Stunden nach dem Tode zu gewinnen.

Alle Gewebe wurden von Fett, Blut oder fremden Geweben befreit und mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Material wurde grob zerkleinert, durch den Latapi gedreht, gewogen und mit der doppelten Gewichtsmenge 37 %igen Glycerins und soviel Essigsäure versetzt, daß die Glycerinmenge stets 0,15 % wasserfreie Essigsäure enthielt. Die Mischung wurde unter öfterem Umschütteln 4 Stunden bei 37° belassen.

Dann wurde das Gemisch auf ein Faltenfilter gegeben und das während 48 Stunden durchgegangene Filtrat gewonnen. Es diente als Rohextrakt für die folgenden Versuche.

Von Tumorextrakten wurden je nach Größe des Tumors Mengen von 5 bis 500 g Extrakt gewonnen. Ebenso wurden Extrakte aus der Milz des Rindes, sowie aus menschlichen Geweben (Leber, Milz, Niere, Muskulatur, Haut, Gehirn) gewonnen.

Sogenannte Schnellauszüge [s. *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* (6)] wurden nicht bereitet.

In einzelnen Fällen wurden auch Carcinome bzw. Teile derselben stärker sauer, d. h. kongosauer, sowie schwach und stark lackmusalkalisch extrahiert. Diese Extrakte waren im allgemeinen in der Spaltwirkung nicht besser, nur filtrierten, wie gesagt, die alkalischen sehr viel schlechter als die sauren. Auch wurden sie im Gegensatz zu den fast klaren Normalauszügen bald stark getrübt oder flockig.

Die Extrakte wurden meist erst nach mehrtägigem Stehen verwandt. Die Wirksamkeit derselben blieb während längerer Zeit (Monate) annähernd die gleiche bzw. nahm sie nur sehr langsam ab. Dagegen wurde des öfteren beobachtet, daß die Extrakte unmittelbar nach der Herstellung wesentlich wirksamer waren als nach mehrtägigem Stehen.

Von den Tumoren wurden vor der Extraktbereitung histologische Präparate angelegt.

Verzeichnis der Extrakte.

A. Tumoren.

Extrakt Nr.	Carcinome Herkunft	Extraktion	Schnitt (hist.)	Extraktausbeute g
I	Magen	schwach sauer	A_1	11
II	Mamma	„ „	10 167	12
III	„	wurde geteilt	10 172	
		a) schwach sauer (Lackmus schwach rot)		15
		b) schwach alkalisch (Lackmus schwach blau)		11
IV	„	geteilt	10 178	
		a) stark sauer (mit Eisessig kongosauer)		30
		b) stark alkalisch (35 g Glycerin + 2 ccm NaOH n/10)		23
V	„	schwach sauer	10 771	3
VI	„	„ „	10 782	13
VII	„	„ „	10 783	27
VIII	„	„ „		19
IX	Leber	„ „	B_1	550
X	Tumor axillaris (Sarcom)	„ „		96
XI	Pankreas	a) schwach sauer	B_2	55
		b) schwach alkalisch (60 g Glycerin enth. 0,5 ccm n/10 NaOH)		25
		c) wäss. Extrakt (Hedin) schwach sauer		38
XII	Hirn	a) schwach sauer		82
		b) schwach alkalisch (80 g Glycerin enth. 0,6 ccm n/10 NaOH		33
XIII	Mamma	schwach sauer		2
XIV	Leber	„ „	B_3	165

B. Extrakte aus menschlichen Organen.

Die Extraktion geschah wie in der allgemeinen Vorschrift angegeben (d. h. nachstehend durchweg schwach saure Glycerinextrakte).

O III	Leber	*O* IX	Leber
O IV	Muskel	*O* X	Milz
O V	Milz	*O* XI	Niere
O VI	Niere	*O* XII	Hirn
O VII	Hirn	*O* XIII	Muskel
O VIII	Haut		

C. Rindermilzextrakte.

R I Glycerinextrakt, schwach sauer,
R II Glycerinextrakt, schwach sauer,
R III Glycerinextrakt, a) schwach sauer, b) kongosauer, c) schwach alkalisch (50 g Glycerin enthalten 0,4 ccm n/10 NaOH),
R IV wässerige Extrakte nach *Hedin* (saure und alkalische Fraktionen),
R V Glycerinextrakte, a) schwach sauer, b) schwach alkalisch.

2. Bestimmungsmethoden.

Als Bestimmungsmethoden werden (bis auf die Eichungen nach *Waldschmidt-Leitz*) die folgenden nephelometrischen Methoden gegeben. Sie ermöglichen die Untersuchung so kleiner Fermentmengen, wie sie in den meist geringen Materialmengen vorhanden sind und erfassen nur die tatsächliche Proteinasenwirkung.

a) Proteinasen.

Allgemeine Vorschrift für die optischen Proteinasebestimmungen.

Nach *P. Rona* und *H. Kleinmann* (33) wird eine verdünnte Eiweißlösung bei bestimmtem p_H bei 37° einer Einwirkung von Fermentlösungen ausgesetzt. Vor und nach der enzymatischen Einwirkung werden Abnahmen gemacht, die nach Hinzufügen eines Trübungsmittels miteinander im Nephelometer nach *Kleinmann* (*Schmidt* und *Haensch*, Berlin) verglichen werden. Setzt man den Eiweißgehalt der Anfangsabnahmen gleich 100%, so läßt sich die proteolytische Aufspaltung in Prozenten ermitteln.

Die Ansätze: Zu der Substratlösung (Casein, Gelatine, Edestin, Serumeiweiß, Eigeneiweiß der Fermentextrakte und Organe, etwa 10 bis 20 ccm) wird zwecks Einstellung der gewünschten Azidität eine bestimmte Menge Puffer, Säure bzw. Lauge gegeben. Die Mengen sind jeweils in Probeansätzen auszuprobieren. Wegen der sehr geringen Aziditätsveränderungen beim Arbeiten mit stark verdünnten Substraten ist es oft nicht nötig, im deutlich sauren Gebiete (Kathepsin) die Ansätze zu puffern. Die Pufferung durch die vorhandenen Eiweißmengen genügt durchaus. Im schwach alkalischen Gebiete (Untersuchungen auf Tryptase) ist die Anwendung von Puffern ratsam. Das Flüssigkeitsvolumen wird mit destilliertem Wasser auf 46 ccm ergänzt. Davon werden 10 ccm entnommen, von denen zweimal 4,5 ccm als sogenannte Nullabnahmen in Gläschen gegeben werden; der restliche 1 ccm wird verworfen. Zu dem jetzt 36 ccm betragenden Ansatz gibt man bei fixierter Zeit 4 ccm verdünnten Enzymextrakt und einige Tropfen Toluol. Bei kurz dauernden Versuchen wurden die Systeme und Fermentextrakte vor der Mischung getrennt vorgewärmt. Nach Durchmischen wird das System bei 37° innerhalb der gewünschten Spaltzeit untersucht.

Schema des Ansatzes: 10 bis 20, meist

12 ccm Substratlösung
\+ x „ Essigsäure (bzw. Natronlauge) n bis n/100 bzw. Puffer
\+ Wasser zu 46 ccm
— 10 ccm Entnahmen (zweimal 4,5 ccm + 1)
\+ 4 „ Extraktverdünnung.

Reaktionsvolumen = 40 ccm.

Die Abnahmen: In bestimmten Zeitpunkten werden je zweimal 5 ccm aus dem Ansatz entnommen. Die Entnahmen werden in Reagenzgläsern vorbehandelt und mit einem Trübungsmittel versetzt. Nach bestimmter Zeit wird gegen die Nullabnahmen verglichen, die ebenso behandelt wurden. Zuvor wurden die letzteren, um stofflich und auch hinsichtlich der Färbung gleiche Bedingungen zu erzielen, mit 0,5 ccm der angewandten Ferment-

lösung auf 5 ccm ergänzt. Da das System sofort einer Trübungsreaktion unterworfen wird, die Messung in der Kälte und innerhalb kurzer Zeit erfolgt, kommt eine fermentative Wirkung in diesem System nachträglich nicht in Frage. Die Vorbehandlung für die Trübung besteht im allgemeinen in einem Unterbrechen der Spaltung (Aufkochen, p_H-Änderung usw.) und Puffern auf bestimmten p_H, wie er für die optische Analyse jeweils notwendig ist. Sodann wird die Mischung auf ein bestimmtes Volumen (meist 20 bis 25 ccm) gebracht und nephelometrisch (oder in Spezialfällen im Kolorimeter, s. Gelatinemethode) untersucht.

In dem restlichen Teil des Ansatzes wird der p_H bestimmt.

Für Versuche, die nicht innerhalb kurzer Zeiten (z. B. einiger Stunden) durchgeführt werden konnten und bei denen mehrere Abnahmen innerhalb der Spaltzeit notwendig waren, wurden die Abnahmen nicht gemeinsam am Ende der Spaltung, sondern stets gleich nach der Abnahme analysiert. Es ist dies nicht notwendig, aber in speziellen Fällen, in denen Veränderungen eintreten können, zweckmäßig. Es wird hierfür der Ansatz in doppelten Volumen hergestellt und aus ihm vier Nullabnahmen entnommen, die dann als Standard für die verschiedenen Spaltabnahmen jeweils benutzt werden. Statt dessen kann man auch gegen eine Nullabnahme den Trübungsstandard nach *Kleinmann* (*Schmidt* und *Haensch*, Berlin) einstellen und diesen noch für den ganzen Versuch gebrauchen.

Die Messung: Bestimmte Zeit nach Hinzufügen des Trübungsreagenses werden zunächst die beiden Nullabnahmen verglichen. Danach wird eine der beiden Nullabnahmen als Standard (100 % Eiweiß) angenommen und die Spaltabnahmen gegen diese verglichen. Die Berechnung geschieht nach der Beziehung: $x = a \cdot 100/b$, wobei a das Mittel aus den Höhen der verglichenen Nullabnahmen (Vergleichslösung oder Standard, z. B. 20 mm), b die gefundene Höhe der unbekannten Trübung und x die gesuchte Eiweißkonzentration (in Prozenten) bedeuten.

Die Resultate werden nicht in Eiweißkonzentration (x), sondern in Prozent-Spaltung (d. h. $100 - x$) angegeben.

Der Abbau des Eigeneiweißes der Fermentlösungen ist bei den hohen Verdünnungsgraden derselben zu vernachlässigen (zum Teil wird das Eigeneiweiß durch die Trübungsreaktion gar nicht erfaßt, so daß analytisch allein der Abbau des zugefügten Substrats zur Messung kommt).

Spezielle Methodenangaben.

Substrat: Casein.

Methode: Als Substrat dient Caseinlösung; die Abnahmen der Caseinansätze werden neutralisiert, gepuffert und mit Chinidinhydrochlorid getrübt.

Reagenzien: Casein: 0,25 %ige wässerige Lösung (2,5 g Casein „*Hammarsten*“ und 6 ccm n Natronlauge im Liter; *m/15 Phosphatpuffer und Essigsäure* verschiedener Normalität zur Einstellung der p_H; *Natronlauge* zum Neutralisieren der Abnahmen, *Vorlagepuffer* (m/15 Phosphatpuffer, p_H 7,8); *Chinidinhydrochloridlösung* (warm gesättigt) schwach sauer (E. Zimmer & Co., Frankfurt a. M.)[1]

[1] Wir danken der Firma *E. Zimmer & Co.* für die freundliche Überlassung des Präparates.

Ansatz: 12 ccm Caseinlösung (0,25 %ig) + Essigsäure (z. B. 5 ccm n-Essigsäure für p_H etwa 3 oder m/15 Phosphatpuffer + Wasser zu 46 ccm. Die Ansätze bleiben je nach dem gewünschten p_H klar, trübe oder geflockt. Im letzteren Falle muß vor den Abnahmen gut geschüttelt werden, wodurch die Verteilung stets eine homogene wird. Bei den Caseinansätzen kann es, abgesehen im p_H etwa 4, wo das Casein an seinem isoelektrischen Punkte ausflockt, auch bei p_H etwa 7 zu einer Flockung kommen. Dieselbe scheint auf der Wirkung des Eiweißes der Fermentextrakte auf das Casein zu beruhen, denn sie ist hauptsächlich nur bei Anwendung wenig verdünnter oder stark bluthaltiger Extrakte zu beobachten. Da diese Flockung sich schlecht wieder löst (z. B. durch Alkali), können daher bei p_H etwa 7 bei den genannten Extrakten methodische Unregelmäßigkeiten entstehen. Es empfiehlt sich dann ein Arbeiten mit stärker verdünnten Extrakten bzw. Kontrolle dieses p_H-Punktes auch durch ein anderes Substrat.

Abnahmen: Diese werden neutralisiert, um die Spaltung zu unterbrechen, und zwar mit Natronlauge (n bis n/100), je nach dem p_H des Systems. Es sollen nicht mehr als 5 ccm verwandt werden. Es ist soviel Lauge hinzuzusetzen, bis die Trübung oder die sich durch den Laugenzusatz trübende Lösung gerade wieder klar geworden ist.

Die Lösungen werden mit Wasser auf 10 ccm ergänzt, mit 5 ccm Vorlagepuffer und 7,5 ccm Chinidinlösung versetzt. Die nephelometrische Messung erfolgt 20 Minuten nach der Chinidinzugabe mittels des Nephelometers von *Schmidt* und *Haensch* (Berlin). Die Trübung ist beständig und gut meßbar. In den Nullabnahmen sind etwa 3 mg Casein enthalten. Nur Ausschläge über 5 % (etwa dreifacher nephelometrischer Fehler) werden zur Analyse bewertet.

Substrat: Gelatine.

a) Nephelometrische Methode.

Methode: Als Substrat dient Gelatinelösung. Abnahmen und Nullabnahmen der Gelatineansätze (nach *Kleinmann* und *Stern*) werden nach Trübung mittels Sulfosalicylsäure nephelometrisch verglichen.

Reagenzien: Gelatine: 1 %ige wässerige Lösung von Gelatine alba, pulverisiert, D.A. B. 6 (jedesmal frisch bei 37° zu lösen). *Phosphatpuffer* (m/15) oder Essigsäure bzw. Natronlauge verschiedener Normalitäten zur Einstellung der p_H. *Sulfosalicylsäure*, 20 %ige, wässerige Lösung.

Ansatz: Es werden z. B. 12 ccm Gelatinelösung (1 %ig) mit x ccm m/15 Phosphatpuffer oder Säure bzw. Lauge (z. B. 1,3 bis 1,5 ccm m/100 Essigsäure für p_H etwa 4) und Wasser zu 46 ccm versetzt.

Menge der Abnahme (s. Allgemeine Vorschrift, S. 118).

Abnahmen: In alle Abnahmen werden 11 ccm destillierten Wassers und 4 ccm Sulfosalicylsäure gegeben.

Ein Aziditätsausgleich ist infolge der großen Sulfosalicylsäuremengen überflüssig.

Der früher verwandte Zusatz von Salzsäure wurde nicht mehr genommen.

Die Ansäuerung genügt auch zur Unterbrechung der Spaltung.

Nach genau 5 Minuten werden die Trübungen im Nephelometer verglichen.

Die Haltbarkeit der Trübung ist gering, aber im sauren Gebiet durchaus ausreichend. Parallelbestimmungen sind unumgänglich notwendig.

Messung: Bei Einhaltung aller Bedingungen stimmen die Parallelen praktisch überein; man erhält brauchbare, jedoch nicht immer absolut exakte Resultate. Die Werte einer Verdünnungseichkurve (s. Abb. 1) weichen um ein Geringes (etwa 5 bis 10 %) von der Theorie ab (umgekehrte Proportionalität zwischen Schichthöhe und Konzentration) und sind der Messung zugrunde zu legen. Der Eiweißgehalt in 5 ccm Nullabnahme beträgt 12 mg Gelatine. Erst Aufspaltungen über 10 % Eiweiß wurden analytisch bewertet.

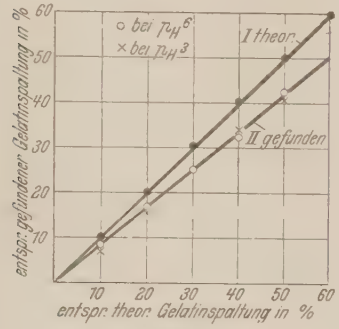


Abb. 1*.
Gelatine-Eichkurve (nephelometrisch).

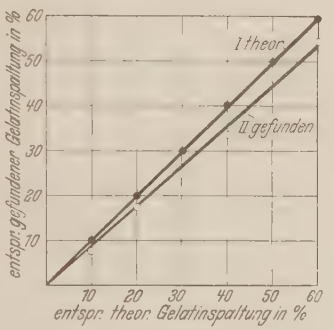


Abb. 2.
Gelatine-Eichkurve (kolorimetrisch).

b) Kolorimetrische Methode.

Methode: Die nephelometrische Methode zeigt den bereits von *Kleinmann* und *Stern* angegebenen Nachteil, daß bei Gelatine im Gebiet unter p_H etwa 6 Anomalien auftreten. Von Parallelen werden die Trübungen mitunter verschieden stark geflockt; vor allem zeigten die Lösungen mitunter mit bloßem Auge betrachtet deutliche Trübungsabnahmen, ohne daß eine solche im Nephelometer zu beobachten war. Es muß sich hier um eine Kompensation von Konzentrationsabnahmen und Teilchengrößenänderung handeln. Aus diesem Grunde zeigte es sich als vorteilhafter, für die Vergleichung die Betrachtung im Kolorimeter vorzunehmen, da hierbei die beobachteten Anomalien nicht so störend auftraten.

Es war jedoch notwendig, auch bei kolorimetrischer Betrachtung Eichkurven anzulegen. Dieselben wurden für p_H 4, 6, 7, 8, 9 und 10 hergestellt, da die Abweichungen der Eichkurve von der theoretischen mit der Azidität etwas variieren. Mittels solcher Kurven ist aber dann die Spaltung mit ausreichender Genauigkeit verfolgbar (vgl. hierzu als Beispiel die Eichkurve für p_H 4, Abb. 2).

Substrat: Edestin.

Methode: Entsprechend einer Vorschrift von *K. G. Stern* (34) wird eine Edestinlösung auf einen bestimmten p_H gebracht und bei 37° der enzymatischen Einwirkung überlassen. Die Abnahmen werden, so weit sie

* In den Abbildungen ist das Wort „Gelatinspaltung" durch „Gelatinespaltung" zu ersetzen.

in alkalischen Gebiet getrübt sind, durch Säurezusatz in klare Lösungen gebracht und mittels Sulfosalicylsäure getrübt. Die Trübungen werden im Nephelometer untersucht.

Reagenzien: Edestin: In 1000 ccm 0,03 n Salzsäure wird 1 g Edestinpulver bei etwa 80° gelöst. Die Lösung wird ebenso wie vor jedesmaligem Gebrauch filtriert und unter Toluol im Kühlschrank aufbewahrt. *Lösungen zur Einstellung der Aziditäten.* Puffer (z. B. m/15 Phosphat), Salzsäure und Natronlauge verschiedener Konzentrationen n/1 bis n/100. *Salzsäure,* zur Klärung der Abnahmen (n bis n/10). *Sulfosalicylsäure,* 20 %ige, wässerige Lösung.

Bestimmung: 20 ccm der Edestinlösung werden mit n/10 Natronlauge (z. B. 6 ccm) neutralisiert und mit m/15 Phosphatpuffer (oder Säure bzw. Lauge) auf 46 ccm gebracht. Wie üblich werden 10 ccm für Nullabnahmen entnommen. Die Ansätze werden mit 4 ccm Extraktverdünnung bei 37° der Fermentwirkung unterworfen. Für die Einstellung der sauren p_H wird die saure Edestinlösung nicht vollständig mit Natronlauge neutralisiert, sondern der Säureüberschuß nur annähernd zu dem gewünschten p_H abgestumpft, worauf die Ansätze dann mit m 15 primären Phosphats auf das Reaktionsvolumen bzw. auch auf den endgültigen p_H gebracht. Im Gebiet zwischen p_H 7 und 9 sind die Ansätze stark geflockt. Die Abnahmen nach der Reaktion sowie die mit Extraktverdünnung auf 5 ccm ergänzten Nullabnahmen werden, wenn nötig, mit n/10 Salzsäure in Lösung und mit Wasser auf 16 ccm gebracht. Endlich wird mit 4 ccm Sulfosalicylsäure getrübt und unmittelbar darauf die Messung vorgenommen.

Für die Messung ist vorherige sorgfältige Durchmischung unbedingt notwendig. Man erhält gut meßbare und innerhalb des üblichen nephelometrischen Fehlers übereinstimmende Trübungswerte.

Substrat: Serumalbumin.

Methode: Nach der etwas abgeänderten Methode von *Kleinmann* wird Serumalbumin im üblichen nephelometrischen Ansatz der enzymatischen Einwirkung ausgesetzt und Null- und Endabnahmen nach etwa 48 Stunden untersucht. Mit Sulfosalicylsäure erzeugte Trübungen, die durch Salzsäure stabilisiert wurden, wurden nephelometrisch gemessen.

Reagenzien: Serumalbumin. Hergestellt aus Pferdeserum durch Aussalzen des Globulins mittels gesättigter Ammonsulfatlösung und Dialysieren gegen fließendes Wasser bis zur Salzfreiheit. Aufbewahrung unter Toluol. Zum Gebrauch wird um das Zwei- bis Zehnfache verdünnt und eventuell zentrifugiert. *Essigsäure* und *Natronlauge* verschiedener Normalität zur Aziditätseinstellung. *Salzsäure,* 25 %ige, wässerige Lösung. *Sulfosalicylsäure,* 20 %ige, wässerige Lösung.

Ansatz: 12 ccm einer Albuminverdünnung 1 : 3 (mit Wasser) werden z. B. mit 0,2 ccm n Essigsäure (für p_H etwa 4) und Wasser zu 46 ccm versetzt. Nullabnahmen usw. wie bei den anderen Substraten.

Messung: Zu den Abnahmen werden 5 ccm Wasser, 5 ccm Salzsäure und 7,5 ccm Sulfosalicylsäure gegeben. Nach 5 Minuten kann die Trübung nephelometrisch untersucht werden. Die Trübungen lassen sich gut vergleichen und sind haltbarer als die Gelatinetrübungen. Nur Aufspaltungen über 5 % werden als sicher bewertet.

Substrat: Eigeneiweiß der Fermentlösung (Glycerinextrakt).

Methode: Glycerinextrakt, der weit weniger verdünnt wird als bei Zugabe eines fremden Substrats, d. h. nur so weit, daß sein Eigeneiweißgehalt als Substrat gut meßbar ist, wird mittels Puffer auf einen bestimmten p_H gebracht. Nach Spaltung bei 37° werden Abnahmen gemacht. Die Trübung geschieht mittels Sulfosalicylsäure nach Stabilisierung durch Salzsäure.

Die Messung geschieht im Nephelometer.

Reagenzien: Pufferlösungen (z. B. m/15 Phosphatpuffer) und *Salzsäure* sowie *Natronlauge* zur Einstellung der p_H. *Sulfosalicylsäure* (wässerige Lösung, 20 %ig). *Salzsäure* (25 %ig) zur Stabilisierung.

Bestimmung: Von 28 ccm m/15 Phosphatpuffer (bzw. Gemisch eines solchen mit Säure oder Lauge) werden 10 ccm für die beiden üblichen Nullabnahmen von je 4,5 ccm entnommen. Zu den vorgewärmten restlichen 18 ccm werden 2 ccm Fermentextrakt (meist 1 : 2 bis 1 : 5 mit Wasser verdünnt) und etwas Toluol gegeben.

Nach einer Spaltzeit von 1 bis 24 Stunden werden Abnahmen von 5 ccm gemacht. Die Nullabnahmen werden mit der auf Eis aufbewahrten Fermentlösung auf 5 ccm ergänzt. Alle Abnahmen werden mit 5 ccm Wasser, 5 ccm Salzsäure (25 %ig) und 7 ccm Sulfosalicylsäure versetzt; die recht gut haltbaren Trübungen werden nach einigen Minuten nephelometrisch gemessen. Die Parallelen stimmen gut überein. Vorteilhaft erscheint es, Salzsäure und Trübungsmittel vor der Zugabe zu vermischen und gemeinsam anzuwenden.

Substrat: Menschliches Organeiweiß.

Herstellung der Eiweißlösung. Da auch einige Versuche bei Anwendung von Eiweiß menschlicher Organe als Substrat vorgenommen wurden, soll kurz die Herstellung der Substratlösungen und die Meßmethodik beschrieben werden.

Benutzt wurden Eiweißlösungen aus Leber und Muskel (quergestreift).

Die Herstellung der Lösungen geschah entsprechend einer Vorschrift von *J. Pohl* (35). Die Organe wurden sorgfältig durch Ausspülen mittels physiologischer Kochsalzlösung entblutet (z. B. bei der Leber rückläufig von der Vena cava aus) und durchspült, bis das Spülwasser klar durchlief; Muskulatur wird nach gutem Zerkleinern wiederholt ausgespült.

Die Organe wurden dann gut zerkleinert; eine bestimmte Menge des Organbreies (z. B. bei Leber 0,5 kg) wurde mit der dreifachen Menge physiologischer Kochsalzlösung durchrührt, mit Toluol konserviert und unter öfterem Durchmischen 24 Stunden im Eisschrank gehalten. Nach dieser Zeit wurde filtriert und das Filtrat solange auf das Filter zurückgegeben, bis eine klare, gelbe, serumartige Lösung resultierte. Diese Lösungen sind nur einige Wochen haltbar.

Ansätze und Abnahmen: Für die nephelometrischen Ansätze wurden diese Eiweißlösungen mit Kochsalzlösung (0,8 %ig) im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und 12 ccm davon mit Essigsäure bzw. Natronlauge für die Einstellung der p_H versetzt und mit Kochsalzlösung auf ein Volumen von 46 ccm gebracht. Die sauren Ansätze sind je nach Azidität mehr oder weniger stark getrübt. Ebenso wie bei den anderen Substraten wurden Nullabnahmen und nach gewünschten Zeiten (meist 24 Stunden) Abnahmen gemacht.

Ähnlich wie bei den Caseinversuchen wurden die Abnahmen bis zur Klarheit mit Natronlauge versetzt und mit Kochsalzlösung auf 10 ccm gebracht. Mit 10 ccm einer Mischung von Salzsäure (25 %ig) und Sulfosalicylsäure (20 %ig) im Verhältnis 1 : 1 wurden die Trübungen hergestellt, die sich mindestens 10 Minuten homogen halten und gut nephelometrisch untersuchen lassen. Bei einer Eichkurve entsprechen die gefundenen Werte ziemlich gut den theoretischen. Nur Zuwächse über 5 % gelten als sicher.

Bestimmung der Proteinasen nach Waldschmidt-Leitz (7).

Entsprechend den Arbeiten von *Waldschmidt-Leitz* sowie *Kleinmann* und *Stern* wurde die proteolytische Wirksamkeit durch Bestimmung der frei gelegten Aminogruppen nach *van Slyke* ermittelt.

Als Substrat wurde Gelatine benutzt. Für die Spaltung wurde eine Zeit von 24 Stunden und eine Temperatur von 37° (größere Ausschläge) gewählt. Da der Berechnung von *Waldschmidt-Leitz* eine Temperatur von 30° zugrunde liegt, mußten die gefundenen Zahlen durch einen Temperaturkoeffizienten dividiert werden.

Ausführung der Bestimmung: Der Ansatz enthielt in 20 ccm Volumen 10 ccm Glycerinextrakt, 5 ccm Gelatine (8 %ig) und zur Einstellung der Azidität entsprechende Mengen Säure, oder Puffer. Aufgefüllt auf das obige Volumen wurde mit Wasser oder bei den Aktivierungsversuchen mit Schwefelwasserstoffwasser (2 mg H_2S/1 ccm) — meist 4 ccm. (Durch 4 ccm H_2S-Wasser waren die Extrakte bei den gewählten Bedingungen voll aktiviert; Einleiten von H_2S in die Ansätze veranlaßte keine größeren Ausschläge.)

Die Glycerinkonzentration der Ansätze war vorschriftsmäßig rund 35 %.

Aus den Ansätzen wurden bestimmte Mengen (1 bis 2 ccm) entnommen und in dem Apparat von *van Slyke* (Mikroausführung, Zugabebürette 2 ccm, Gasbürette 3 ccm Inhalt) nach 5 Minuten dauerndem Schütteln (längeres Schütteln zeigte sich ohne Einfluß) untersucht. Die Ansätze wurden mit einigen Tropfen Toluol konserviert, der fermentativen Einwirkung überlassen und dann analog Endabnahmen untersucht. Sowohl bei der Bestimmung der Anfangsabnahmen als auch bei den Endabnahmen wurden Leerbestimmungen (Wasser statt Substrat) ausgeführt.

Ebenso wie bei den Ansätzen wurde auch hier in Parallelen gearbeitet.

Ferner wurden einige Versuche über Eigeneiweißabbau angestellt.

Bei jedem Versuch wurden ferner gemessen: p_H des Ansatzes, Zimmertemperatur und der herrschende Luftdruck.

b) Ereptase (Dipeptidase).

Die Bestimmung von Erepsin geschah in Ergänzung der Arbeiten von *Kleinmann* und *Stern* (7), die nach der Methode von *Waldschmidt-Leitz* gearbeitet haben, nach der empfindlicheren Methode von *Linderström-Lang* (36) durch Titration der gebildeten Aminogruppen mit n/20 Salzsäure.

Das Substrat wird in Stammlösungen von bestimmten p_H bereitgehalten. Zur Anwendung gelangten die beiden Dipeptide Leucyl-Glycin und Glycyl-Glycin in Phosphatpuffer (p_H 7) oder in Ammonchlorid-Ammoniaklösung (p_H 8) (Konzentration 0,2 mol.).

Die Einstellung der Azidität geschah mittels m/15 Phosphat- oder Boratpuffer. Vorversuche konnten bestätigend zeigen, daß die Art des Puffers das Titrationsergebnis nicht ändert.

Die Messung der p_H erfolgte kolorimetrisch bei Zimmertemperatur.

Für die Ansätze werden 1 ccm Stammlösung mit 1,5 ccm Puffer, 1,5 ccm Glycerin-Wasser gemischt (30% Glycerin) und 1 ccm Fermentlösung (1 : 2) auf ein Volumen von 5 ccm gebracht. Alle Lösungen wurden bei der Reaktionstemperatur von 37° vorgewärmt.

Vor und nach einer Spaltzeit von 15 Stunden werden je 2 ccm entnommen. Sie werden mit 20 ccm Aceton und 4 ccm n/20 alkoholischer Salzsäure sistiert und, um Ausfällungen zu verhindern, noch mit 3 ccm Wasser versetzt.

Die Titration geschah mittels n 20 alkoholischer Salzsäure gegen Naphthylrot als Indikator. Es wurden durchschnittlich 2 bis 3 ccm Salzsäure verbraucht.

Der nach den Abnahmen verbliebene 1 ccm wird zur Messung des p_H mit Wasser auf 2 ccm verdünnt.

3. Reinigungsmethoden und Konzentrationsbestimmung.

a) Reinigung.

Um zu untersuchen, ob die Reinigung der Carcinomextrakte und somit die Trennung von Protease und Ereptase Resultate gibt, die denen der Milzextrakte, wie sie *Kleinmann* und *Stern* (7) erhielten, entsprechen, wurden die Rohextrakte nach den Vorschriften dieser Autoren weiter behandelt, die sich an die Methode der Adsorption und Elution von *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* anlehnen (6).

Als Adsorbens wurde Edelkaolin benutzt, das nach der Vorschrift von *Willstätter* und *Schneider* (37) durch Behandlung mit Salzsäure gereinigt wurde.

Als Eluens wird meist 1%iges, sekundäres Natriumphosphat (Na_2HPO_4, wässerige Lösung ohne Glycerin) angewandt. In besonderen Fällen (Trockenrückstandsbestimmungen in den Eluaten) kam auch verdünnte Ammoniaklösung zur Elution in Anwendung.

Arbeitsgang: Normalrohauszug wird mit Eisessig auf p_H 4 gebracht und mit dem gleichen Volumen wässeriger Kaolinsuspension (2,2 g Kaolin in 30 ccm) vermischt und nach einigen Minuten zentrifugiert. Die Restlösung der Adsorption wird noch einmal mit der gleichen Kaolinmenge versetzt und wieder zentrifugiert (in den gleichen Gläsern). Die nun erhaltene Restlösung wird so (als dreifache Verdünnung des Rohextraktvolumens) in die nephelometrischen Ansätze gegeben oder verworfen. (Eventuell wurde noch ein zweites Eluat gewonnen.)

Die Adsorbate werden vereinigt und mit etwas Leitfähigkeitswasser gewaschen. Nach Zentrifugieren wird das Adsorbat mit der gleichen Menge Eluens durchschlemmt, wie man Rohextrakt angewandt hat und abermals nach einigen Minuten zentrifugiert.

Das erhaltene Eluat wird entweder direkt benutzt oder noch weiter gereinigt, indem es wieder auf p_H 4 gebracht und mit Adsorbens usw. wie oben behandelt wird.

b) Konzentrationsbestimmung.

Die Konzentration der Glycerinextrakte und Eluate geschah, sofern es sich um Kathepsin handelte, folgendermaßen:

Rindermilzextrakte werden nach der Methode von *Waldschmidt-Leitz* (6) (*van Slyke*) untersucht und die Einheiten [mk (e)] berechnet.

Gegen solche geeichten Extrakte werden schwächere unbekannte Extrakte nephelometrisch verglichen.

Es werden mit den geeichten Rindermilzextrakten Spaltungen erzeugt bei verschiedenen Verdünnungen und mit den erhaltenen Werten (Konzentration/Umsatz) Eichkurven angelegt. Das geschieht sowohl gegen Gelatine als auch gegen Casein. Aus nephelometrischen Spaltungen unbekannter Extrakte und Eluate kann man mit Hilfe dieser Kurve die den Spaltwerten entsprechenden Einheiten ermitteln. Diese Einheiten kann man auf die Trockensubstanz der Glycerinextrakte $[K(w)]$ als auch auf die Gewichtseinheit der Frischsubstanz $[K_1(w)]$ beziehen.

In dem Kapitel IV werden die hier skizzierten Auswertungsmethoden eingehend behandelt.

III. Qualitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen.

1. Versuche zur Kinetik der Proteinasen.

a) Beziehung zwischen Umsatz und Zeit.

Im folgenden werden Versuche über die Gestalt der Zeit-Umsatzkurve angestellt. Und zwar werden Extrakte aus Rindermilz mit solchen aus menschlichen Carcinomen verglichen. Die Zeit-Umsatzkurven werden sowohl mit nativen, unaktivierten bzw. nicht vollaktivierten Rohextrakten angestellt, als auch mit durch H_2S aktivierten Extrakten. Dies bezieht sich auf Kathepsin, da Trypsin nicht durch H_2S aktivierbar ist (s. weiter unten).

Es wird die Wirkung der Extrakte sowohl gegen Casein als auch gegen Gelatine dargestellt.

Substrat: Casein.

Für die meisten der in dieser Arbeit angestellten Versuche wurden Spaltzeiten von 20 bis 24 Stunden gewählt. Dies hatte seinen Grund vorzüglich darin, daß beim Arbeiten mit nicht vollaktivierten Extrakten bzw. mit aktivierten Extrakten, die wenig Ferment enthielten, ausreichende Substratumsätze (etwa 20 bis 50%) erst nach dieser Versuchszeit erzielbar waren. Des weiteren machten Hemmungserscheinungen bei Anwendung von Fermentextrakten, die weniger als 1 : 10 verdünnt waren, und die auf S. 130* besprochen werden, es ratsam, mit Extraktverdünnungen größer als 1 : 10 zu arbeiten; mit diesen Konzentrationen waren aber im allgemeinen eben erst nach 24 Stunden genügende Umsätze erzielt worden. Die Spaltzeiten länger zu wählen, erscheint aus technischen Gründen (bakterielle Zersetzung, sekundäre Reaktionen usw.) nicht ratsam.

Um nun für die Auswertung der verschiedenen Extrakte, wie sie für den späteren quantitativen Vergleich notwendig wird, zu wissen, welcher Teil der Zeit-Umsatzkurve unter den üblichen Versuchsbedingungen eine Umsatzmessung nach rund 20 Stunden erfaßt, wurde

* Siehe hierzu auch die Mitteilung von *P. Rona* und *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **241**, Heft 4/6, 1931.

eine Reihe von Messungen innerhalb 20 Stunden mit zwei bis drei Abnahmen während des Spaltungsverlaufs angestellt.

Es erschien notwendig, festzustellen, ob der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve geradlinig oder entsprechend einem anderen bekannten Reaktionstyp erfolgt, sowie zu prüfen, ob die Spaltung nicht vielleicht schon vor der gewählten Versuchszeit von 20 Stunden zum Stillstand

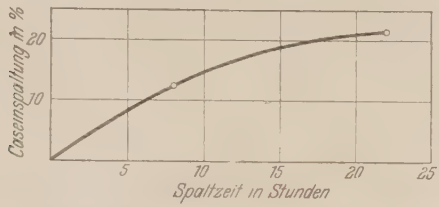


Abb. 3.
Zeit-Umsatzkurve von Carcinomextrakt bei Casein als Substrat.

gelangt, wodurch quantitative Verschiedenheiten der Extrakte fälschlich ausgeglichen werden könnten. Die Versuche 2 bis 4 zeigen Umsätze von Casein durch Carcinomextrakte. Dieselben wurden, da gegen Casein keine Aktivierung möglich ist (s. Abschnitt III, 3a, S. 152), unaktiviert benutzt. Die Arbeitsform ist die gleiche wie beim Versuch 2 angegeben.

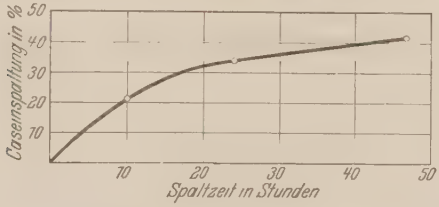


Abb. 4.
Zeit-Umsatzkurve von Carcinomextrakt bei Casein als Substrat.

Die Versuche 2 und 3 zeigen Umsätze bis zu 20 Stunden, Versuch 4 zeigt eine Spaltung bis zu 46 Stunden. Versuche 2 und 4 werden durch die Abb. 3 und 4 veranschaulicht.

Die Versuche zeigen, daß die Spaltung des Caseins während der Versuchszeit zunimmt. Die Zunahme ist aber keine gleichmäßige. Die Umsätze werden vielmehr im Verlauf der Versuchszeit immer geringer, so daß die Zeit-Umsatzkurven nach anfänglich starkem Anstieg sich immer mehr abflachen. Es ergibt sich somit das Bild eines während des Reaktionsverlaufs mit abnehmender Geschwindigkeit sich vollziehenden Umsatzes. Ob die Geschwindigkeitsabnahme des Umsatzes durch Verringerung der Substratmenge oder durch das Auftreten hemmender Spaltprodukte bedingt ist, kann nicht entschieden werden. Es muß hier auf die Untersuchungen von *P. Rona*, *H. Kleinmann* und *E. Dressler* (38) verwiesen werden, die zeigen konnten, daß bei peptischer Spaltung unter Anwendung der nephelometrischen Analyse eine Hemmungserscheinung durch Spaltprodukte nicht zu beobachten

war, während bei der tryptischen Spaltung Hemmungserscheinungen durch Spaltprodukte je nach der Art der gewählten Arbeitsform (konzentrierter oder verdünnter Ansatz) zu erzielen waren oder nicht.

Für den vorliegenden Zweck genügte es, nachzuweisen, daß die Form der Zeit-Umsatzkurve die nämliche bzw. ähnliche ist wie sie bei der Caseinspaltung durch Rindermilzproteinase erhältlich ist.

Abb. 5 zeigt das dem Versuch 5 entsprechende Schaubild einer Caseinspaltung durch Rindermilzproteinase.

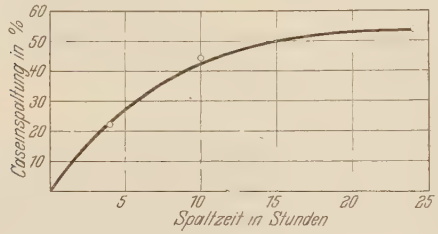


Abb. 5.
Zeit-Umsatzkurve von Rindermilzextrakt bei Casein als Substrat.

Die Kurven lassen sich nicht gewaltsam in die Form eines einfachen algebraischen Ausdrucks zwingen. Berechnet man die Konstanten nach den Formeln für mono- oder bimolekulare Reaktionen, so findet man ein Absinken derselben. Die Zeit-Umsatzkurve paßt sich also auch nicht formal diesen Reaktionstypen an. Dagegen bleiben die Konstanten annähernd in Übereinstimmung, wenn man zur Rechnung die *Schütz*sche Formel $x = q \,.\, \sqrt{t}$ zugrunde legt.

Auf S. 135 ist eine Zusammenstellung der Konstanten für die hier belegten Versuche gegeben, aus der eine recht gute formale Annäherung des Vorgangs an den algebraischen Ausdruck zu beobachten ist. Als t sind die Zeiten 5, 10, 15 und 20 Stunden angenommen. Die zugehörigen Spaltungen x sind aus den Kurvenbildern entnommen.

Substrat: Gelatine.

Ebenso wie vorangehend wurden Zeit-Umsatzkurven mit Gelatine als Substrat angestellt. Als Fermentlösungen wurden mit H_2S aktivierte

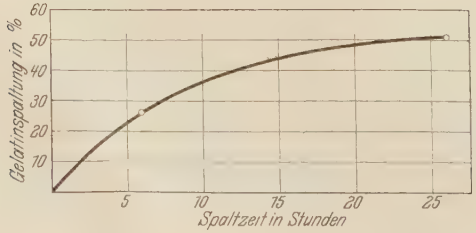


Abb. 6.
Zeit-Umsatzkurve von Carcinomextrakt bei Gelatine als Substrat.

Extrakte benutzt, da eine Anzahl Carcinomextrakte ohne Aktivierung Gelatine nicht genügend angreifen (s. Abschnitt 3a, S. 155).

Die Versuche 6 und 7 geben die Umsätze mit Carcinomextrakt und Rindermilzextrakt (Abb. 6 und 7). Der Umsatz durch Carcinomextrakt betrug nach 27 Stunden 51%, der Umsatz durch Milzextrakt nach $22^1/_2$ Stunden 42%.

Die beiden Abbildungen zeigen die gleichartige Form der Umsatzkurven von Carcinom- wie von Milzextrakt. Es gilt somit für die

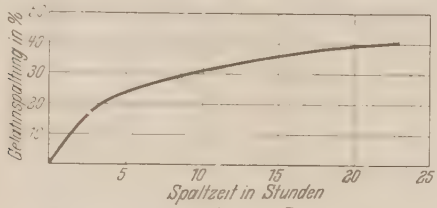


Abb. 7.
Zeit-Umsatzkurve von Milzextrakt bei Gelatine als Substrat.

Gelatinekurven das gleiche, was für die Caseinkurven gesagt wurde. Auch hier passen sich die Kurven recht gut formal der *Schütz*schen Regel an (s. S. 135).

b) Beziehung zwischen Umsatz und Fermentkonzentration.

Substrat: Casein.

Da es bei allen Berechnungen notwendig ist, aus Umsätzen Schlüsse auf Fermentmengen zu ziehen, war es notwendig, die Beziehung zwischen Umsatz und Fermentmenge zu prüfen. Auch wenn die Eichung einer Fermentlösung methodisch an die Erzielung eines bestimmten Umsatzes unter gegebenen Versuchsbedingungen geknüpft ist, so daß als endgültiges Maß die Verdünnung anzusehen ist, bei der der untersuchte Extrakt den geforderten Umsatz liefert, so ist technisch doch nicht immer diese Vergleichsumsatzgröße genau zu erreichen. Meist liegt die erhaltene Spaltung nur in der Nähe der geforderten, so daß die Berechnung der Fermentmenge noch eine Korrektur entsprechend den verglichenen Umsätzen erhält. Da die gesuchte und die erhaltene Umsatzmenge meist nahe beieinander liegen, so entspricht diese Korrektur meist einer proportionalen Beziehung zwischen Umsatz und Fermentmenge bei gleicher Umsatzzeit. Trotzdem ist es nötig, die Art der Funktion festzustellen.

Als erstes Beispiel für die Beziehung zwischen Fermentmenge und Konzentration diene Versuch 8.

Zur Spaltung diente ein Milzextrakt der nach der Methode von *van Slyke* entsprechend den Angaben von *Waldschmidt-Leitz* geeicht war. Es wurde gegen Gelatine festgestellt, wie viel kleine Kathepsin-

einheiten mk(e) der Extrakt unaktiviert enthielt. Aus diesem Betrag [200 bis 210 mk(e), abgerundet] ergeben sich die Kathepsineinheiten der bereiteten Extraktverdünnungen. Es wurden zwölf verschiedene Verdünnungen zur Spaltung benutzt. Der Versuch wird durch Abb. 8 wiedergegeben. Wie dieselbe zeigt, sind die Umsätze (diese sind bis zu 2,5 Einheiten unaktiviert) der Fermentmenge recht gut proportional (s. auch Versuch 9, Abb. 9). Sodann flacht sich die Kurve stark ab, d. h. Zunahme der Fermentmenge bedingt eine immer geringer werdende Spaltungszunahme. Mit Fermentmengen über 15 mk(e), d. h. mit Extraktverdünnungen, die geringer sind als 1 : 15, scheint der Umsatz

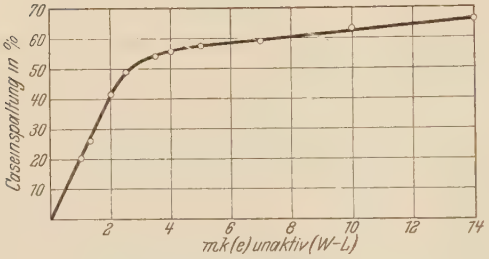


Abb. 8.
Konzentrationsumsatzkurve von Rindermilzextrakt bei Casein als Substrat.

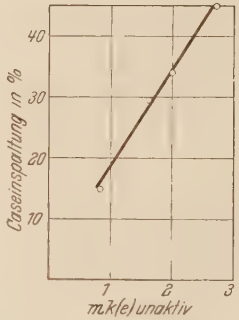


Abb. 9.
Konzentrationsumsatzkurve von Rindermilzextrakt bei Casein als Substrat.

sogar wieder zurückzugehen. Diese Erscheinung, die bei zahlreichen Extrakten beobachtet wurde, ist vielleicht so zu deuten, daß in Fermentauszügen, die weniger als 1 : 10 bis 1 : 15 verdünnt sind, sich Begleitstoffe bemerkbar machen.

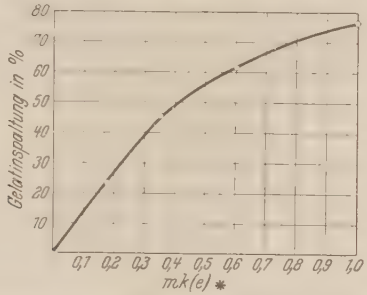
Aus diesem Grunde wurde auch niemals bei Versuchen mit Kathepsin mit geringeren Verdünnungen als 1 : 10 gearbeitet. Auch der Versuch 10 zeigt, daß bei geringen Umsätzen eine genügende Proportionalität zwischen Umsatz und Fermentmenge vorhanden ist. Nunmehr wurden gleichartige Versuche mit Carcinomextrakten angestellt. Die Versuche 11 und 12 geben Spaltungen mit (unaktivierten) Carcinomextrakten in Verdünnungen zwischen 1 : 15 bis 1 : 100, also Konzentrationen, die den Milzextrakten entsprechen.

Die Versuche zeigen, daß bei großen Verdünnungen der Fermentextrakte (Verdünnung 1 : 50 bis 1 : 100, Umsätze bis etwa 20%) der Umsatz der Fermentmenge mit einem kleinen Fehler direkt proportional gesetzt werden kann.

Bei größeren Umsätzen nimmt der Umsatz im Verhältnis zur Fermentmenge rasch ab.

Substrat: Gelatine.

Ganz ähnlich wie bei Casein liegen die Versuchsergebnisse bei Anwendung von Gelatine als Substrat. Die Versuche 13 und 14 zeigen Spaltungen von mit H_2S aktivierten Rindermilzextrakten gegen Gelatine. Abb. 10 zeigt Versuch 14. Da die Umsätze bis zu 80 und 90% hinaufreichen, sieht man wie beim Casein, daß mit steigender Fermentmenge die Umsatzzunahme abnimmt, daß also eine sich abflachende Kurve resultiert. Weiter sieht man aber auch, daß bis zu Umsätzen von 30 bis 40% die Kurve als praktisch geradlinig angesehen werden kann. D. h. auch hier kann im Beginn der Spaltung



* Die Angabe mk(e) bezieht sich hier auf den noch unaktivierten Extrakt und dient somit nur als relativer Maßstab.

Abb. 10.
Konzentrationsumsatzkurve von Rindermilzextrakt bei Gelatine als Substrat.

die Fermentmenge dem Umsatz annähernd proportional gesetzt werden. Daß anscheinend so geringe Fermentmengen [zwischen 0,1 und 1 mk(e), unaktiviert] so starke Umsätze bedingen, beruht auf der stärkeren Aktivierbarkeit der verdünnteren Extrakte (hierüber siehe S. 159). Versuch 15 (Abb. 11) mit unaktiviertem Milzextrakt zeigt bis zu 40% eine ausgezeichnete Proportionalität zwischen Fermentmenge und Umsatz, doch ist ein solches Verhalten nicht immer zu beobachten.

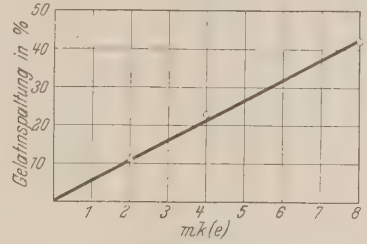


Abb. 11.
Konzentrationsumsatzkurve von Rindermilzextrakt bei Gelatine als Substrat.

Ebenso wie Milzextrakt verhält sich auch Carcinomextrakt. Versuch 16 (Aktivierung mit H_2S) zeigt Proportionalität im Beginn der Spaltung (bis zu etwa 20%).

Zusammenfassend ist also zu sagen, daß die Beziehung zwischen Umsatz und Fermentkonzentration keineswegs einer einfachen Proportionalität entspricht. Sowohl gegen Casein als auch gegen Gelatine als Substrat zeigt sich eine relative Verminderung des Umsatzes bei zunehmender Fermentmenge. Dagegen macht man praktisch nur einen geringen Fehler, wenn man den Anfangsteil der Kurve benutzt, d. h. mit geringen Umsätzen arbeitet und innerhalb dieser Proportionalität Fermentmenge und Umsatz zugrunde legt.

Zur Kinetik der Proteinase bei p_H 8 *(Tryptase)* sind einige Versuche mit Casein als Substrat angestellt worden. Bei Gelatine sind bei diesem p_H die Spaltwerte für diese Zwecke nicht zuverlässig genug. Der Versuch 17 beschreibt das Verhältnis zwischen Umsatz und Umsatzzeit. Die Werte ergeben eine Kurve, die in Abb. 12 wiedergegeben ist. Aus

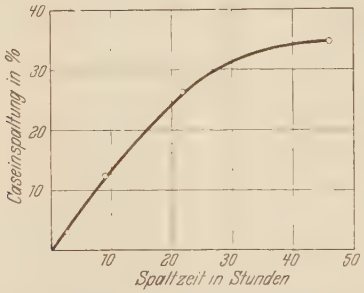


Abb. 12.
Zeitumsatzkurve von Rindermilzextrakt bei p_H 8 bei Casein als Substrat.

dieser Kurve kann man ersehen, daß in den Anfangszeiten der Anstieg ziemlich gleichmäßig und proportional der Zeit erfolgt (bis 24 Stunden), dann aber sich allmählich abflacht und die Zuwächse der Spaltung nur mehr langsam den Zuwächsen der Zeit folgen. Die Kurve ähnelt den aus der Literatur bekannten für die Tryptase. Jedenfalls scheint, wenigstens in den Anfangszeiten, die *Schütz*sche Regel nicht zu gelten. Das Verhältnis „Konzentration — Umsatz" wurde im Versuch 18 studiert. Man erkennt daraus, daß mit steigender Verdünnung die Caseinaufspaltung rasch abnimmt und daß bei fermentärmeren Extrakten (z. B. viele Tumoren, Muskel usw.) bei den üblichen Verdünnungen für das Kathepsinstadium eine Tryptasewirkung kaum zu erwarten ist, was mit den Beobachtungen übereinstimmt.

Versuchsprotokolle.

Beispiel für die Gewinnung eines Glycerinextraktes.

Versuch 1 (Protokoll 124).

Herstellung von Carcinomextrakt VII.

Ein Mammacarcinom wurde sofort nach der Operation von allem umgebenden Gewebe, Blut und Fett befreit, mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und zwischen Filtrierpapier abgetrocknet. Im Latapi

wurde nun die vorher grob zerkleinerte Masse zerquetscht und zerrieben. Die 13.3 g betragende Masse wurde mit der doppelten Gewichtsmenge Glycerin (87 %) verrührt und durch Zusatz von 0.6 ccm n Essigsäure auf einen Essigsäuregehalt von etwa 0.15 % (auf die Glycerinmenge bezogen) gebracht. Das 40 g wiegende Gemisch wurde im Brutschrank bei 37° 4 Stunden unter öfterem Umschütteln digeriert und nach dieser Zeit auf ein Faltenfilter gegeben. Nach 2 Tagen wurde ein Filtrat von 26.9 g erhalten.

Der Auszug war fast klar und von nur leicht gelblicher Färbung.

Versuche zur Kinetik der Proteinasen.

a) Beziehung zwischen Umsatz und Zeit.

Versuch 2 (Protokoll 22).

Carcinomextrakt I, verdünnt 1 : 15, gegen Casein bei p_H 3.8. Spaltzeit 8 und 20 Stunden bei 37°.

Ansätze: 12 ccm Casein (0,25 %) + 0,75 ccm n Essigsäure + Aqua dest. zu 46. Davon entnommen 10 ccm (zweimal 4.5 ccm für Nullabnahmen und 1 ccm verworfen). Zu den restlichen 36 ccm des Ansatzes kommen 4 ccm Fermentverdünnung 1 : 15. Ansatz und Nullabnahmen werden 8 bzw. 20 Stunden bei 37° im Brutschrank gehalten. Nach diesen Zeiten erfolgen die Abnahmen. Diese werden mit Extraktverdünnung zu 5 ccm ergänzt. Zu allen Abnahmen und Nullabnahmen werden gegeben: 0.75 ccm n 10 NaOH (zur Neutralisation) und Wasser zu 10 ccm + Vorlagepuffer (p_H 7.4) sec./prim. Phosphat m/15 (45 + 5), 5 ccm + Chinidin (als Trübungsreagens) 7.5 ccm. Nach 20 Minuten wird nephelometrisch untersucht.

Spaltung in Prozenten (Mittelwerte):

nach 8 Stunden	12,4
„ 22 „	21,7

Versuch 3 (Protokoll 24a).

Carcinomextrakt I, verdünnt 1 : 10 gegen Casein bei $p_H = 6$. Spaltzeit 10 und 20 Stunden.

Ansätze und Abnahmen wie zuvor. Säuremengen für $p_H = 6.1$: 3,5 ccm n/50 Essigsäure.

Spaltung in Prozenten (Mittelwerte):

nach 10 Stunden	19,6
„ 20 „	28,0

Versuch 4 (Protokoll 24b).

Carcinomextrakt I, verdünnt 1 : 10 gegen Casein bei $p_H = 3.1$ bei drei verschiedenen Spaltzeiten.

Ansätze und Abnahmen wie üblich. Säuremengen für $p_H = 3.1$: 3,5 ccm n Essigsäure.

Spaltung in Prozenten (Mittelwerte):

nach 10 Stunden 21,6
„ 24 „ 34,2
„ 46 „ 40,6

Versuch 5 (Protokoll 115).

Milzextrakt *R* II, verdünnt 1 : 50 gegen Casein bei p_H 3. Spaltzeit 3, 10 und 24 Stunden. Temperatur 37°.

Ansatz und Meßmethodik wie bei den vorigen Versuchen.

Ansatz	% Spaltung bei		
	3 Std.	10 Std.	24 Std.
I	21,5	45,6	55,7
II	21,3	44,2	55,9
III	23,1	46,1	54,5
IV		43,5	53,7
Mittel	22,6	45	54

Versuch 6 (Protokoll 149).

Carcinomextrakt VII, verdünnt 1 : 30 bei verschiedenen Spaltzeiten mit H_2S gegen Gelatine bei p_H 4.

Übliche Ansätze, aber in doppeltem Volumen (Doppelansätze siehe Methodik). 20 % der Extraktverdünnung sind gesättigtes Schwefelwasserstoffwasser.

Ansatz	% Spaltung bei	
	6 Std.	26 Std.
I	26	27
II	27	51

Die Werte sind nach einer Eichkurve erhöht und abgerundet.

Versuch 7 (Protokoll 118).

Milzextrakt *R* II (1 : 25) gegen Gelatine bei p_H 5,1, 2.5 und 8,5 und 22,5 Stunden Spaltzeit.

Der Versuch wurde nach der üblichen Gelatinemethodik ausgeführt. Die Messungen geschahen kolorimetrisch.

Die Werte sind Mittelwerte, entsprechend der Eichkurve (s. Methodik) erhöht und abgerundet.

Nach 2,5 Stunden . . . . . 17 % Spaltung
„ 8,5 „ . . . . . 29 % „
„ 22,5 „ . . . . . 41 % „

Zeit-Umsatz-Werte und die *Schütz*sche Regel.

$$x = q\sqrt{t}.$$

Extrakt Substrat	Protokoll	Zeit = t Std.	Spaltung = x %	Konstante = q
R II 1:100 Gelatine + H_2S	119	5	62	27,7
		10	85	26,9
		15	95	24,5
		20	100	22,2
R II 1:25 Gelatine	115	5	23	10,3
		10	37	10,1
		15	37	9,6
		20	40	9,0
R II 1:50 Casein	118	5	30	13,7
		10	45	14,2
		15	51	13,2
		20	54	17,1
		25	55	11,0
Carcinom I 1:10 Casein	24a	5	17	53,7
		10	20	63,2
		15	24	62,0
		20	27	60,4
Carcinom I 1:20 Casein	22	5	8	35,8
		10	12,5	32,5
		15	19	48,9
		20	22	49,2
Carcinom VII 1:30 Gelatine + H_2S	144	5	22,5	10,0
		10	35	11,1
		15	45	11,6
		20	50	11,2
		25	55	11,0
Carcinom I 1:10 Casein	24b	5	12,5	65,9
		10	21	67,4
		15	27	69,7
		20	31	69,3
		25	34	68,0
		30	36	65,7
		40	39	61,7

b) Beziehung zwischen Umsatz und Kathepsinkonzentration.

Versuch 8 (Protokolle 111 und 112).

Milzextrakt *R* II bei zwölf verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 3,03 und 24 Stunden bei 37°.

Übliche Caseinmethodik. Für die einzelnen Verdünnungen wurden die mk(e)-Werte berechnet aus den mk(e)-Werten der *van Slyke*-Methode.

Kathepsingehalt des Extrakts abgerundet 200 bis 210. Die folgenden mk(e)-Werte wurden auf ganze Zahlen abgerundet.

Resultat:

Extrakt-verdünnung	mk(e) (pro 1 ccm Verdünnung)	Spaltung (Mittelwerte) %	Konstante der *Schütz*schen Regel p
1: 5	40	47,3	1,0
1: 10	20	44,5	1,17
1: 15	14	66,3	2,97
1: 20	10	63,0	2,34
1: 30	7	59,9	2,38
1: 40	5	58.2	2,75
1: 50	4	55,5	3,45
1: 60	3,5	54,0	3,15
1: 80	2,8	48,8	3,67
1:100	2	41,3	3,42
1:150	1,3	25,7	2,63
1:200	1	20,0	2,53

Der Versuch zeigt, daß bei einer höheren Verdünnung die Spaltung unter Berücksichtigung des Methodenfehlers eine lineare Funktion der Enzymkonzentration darstellt. Bei einer Verdünnung schwächer als 1 : 50 wird die Spaltung infolge besonderer Einflüsse geringer und unregelmäßiger, als zu erwarten war.

Versuch 9 (Protokoll 229).

Milzextrakt *R* III a bei verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 3 und 25 Stunden Spaltzeit.

Übliche Caseinansätze. Der Extrakt zeigt nach *Waldschmidt-Leitz* ermittelt 160 mk(e) pro 1 ccm.

Ansatz	Extrakt-verdünnung	mk(e) pro 1 ccm	Spaltung %	Mittelwert
I	1 : 60	2,7	45,4	45,2
II			45,0	
III	1 : 80	2,0	40,0	39,0
IV			37,9	
V	1 : 100	1,6	30,2	29,5
VI			28,8	
VII	1 : 200	0,8	15,0	15,0
VIII			14,9	

Versuch 10 (Protokoll 48).

Milzextrakt *R* I bei vier verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 3,2 und 21 Stunden Spaltzeit. Temperatur 37°.

Die Methodik der Caseinansätze ist dieselbe, wie sie stets bei dieser Arbeit angewandt wurde.

Extrakt-verdünnung	mk(e) ccm	Spaltung %
1 : 10	16	29,0
1 : 50	3,2	33,9
1 : 100	1,6	19,5
1 : 200	0,8	10,2

Man erkennt eine kontinuierliche Abnahme der Spaltung zwischen Verdünnung 1 : 50 und 1 : 200 und eine relativ kleinere Spaltung bei Verdünnung 1 : 10.

Versuch 11 (Protokoll 27).

Carcinomextrakt I bei vier verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 3,1 und 12 Stunden Spaltzeit. Temperatur 37°.

Übliche Caseinmethodik.

Extraktverdünnung	Spaltung (Mittelwerte) %
1 : 10	34,5
1 : 25	25,2
1 : 50	19,0
1 : 100	9,9

Es gilt das gleiche wie beim vorigen Versuch.

Versuch 12 (Protokoll 129).

Carcinomextrakt VI bei vier verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 3,05 und 22 Stunden Spaltzeit. Temperatur 37°.

Übliche Methodik.

Extraktverdünnung	Spaltung %
1 : 15	31,2
1 : 30	26,7
1 : 50	22,2
1 : 100	13,6

Man erkennt einen geradlinigen Verlauf der Verdünnungskurve.

Versuch 13 (Protokoll 95).

Rindermilzextrakt *R* I mit H_2S bei verschiedenen Verdünnungen gegen Gelatine bei p_H 5,2 und 18 Stunden Spaltzeit.

Übliche Gelatineansätze. Ergebnisse sind Mittelwerte.

Extrakt-verdünnung	mk(e)	Spaltung %
1 : 180	0,9	90
1 : 300	0,53	75
1 : 600	0,27	50—51
1 : 1000	0,16	etwa 30

Versuch 14 (Protokolle 163 bis 165).

Rindermilzextrakt *R* II in der Verdünnung 1:200 mit H_2S aktiviert; von dieser Lösung wurden weitere Verdünnungen angelegt und mit diesen Gelatine bei p_H 4 gespalten. Spaltzeit 24 Stunden.

Ansätze wie üblich.

Extrakt-verdünnung	mk(e)	Spaltung %
1: 200	1	77
1: 360	0,6	61
1: 600	0,35	45
1:1200	0,18	23

Versuch 15 (Protokoll 116 bis 118).

Rindermilzextrakt *R* II bei verschiedenen Verdünnungen gegen Gelatine bei p_H 4 und 24 Stunden Spaltzeit bei 37°.

Übliche Versuchsbedingungen der Gelatineansätze. Werte sind Mittelwerte.

Extrakt-verdünnung	mk(e)	Spaltung %
1: 25	8	42
1: 50	4	23
1:100	2	11

Versuch 16 (Protokoll 181).

Carcinomextrakt IX mit H_2S gegen Gelatine bei p_H 4. Spaltzeit 20 Stunden.

Übliche Gelatineansätze und übliche H_2S-Menge.

Bei Verdünnung 1: 30 = 40 % Spaltung
„ „ 1: 90 = 21 % „
„ „ 1:180 = 10 % „

Versuch 17 (Protokoll 319).

Zeit-Umsatz-Versuch mit Milzextrakt *R* Va (1 : 25) gegen Casein bei p_H 8

Übliche Caseinansätze (Doppelansätze).

Die Abnahmen wurden sofort analysiert.

Spaltzeit Std.	Spaltung %
2,5	etwa 3
9	12,2
22	26,5
46	34,5

Versuch 18 (Protokoll 201).

Rindermilzextrakt *R* Va bei verschiedenen Verdünnungen gegen Casein bei p_H 8 bis 8,1 und einer Spaltzeit von 20 Stunden.

Verdünnung	Spaltung %
1 : 5	a) 50
	b) 62
1 : 10	41
1 : 20	a) 35
	b) 34
1 : 25	a) 29
	b) 27
1 : 50	16

Man erkennt, daß mit steigender Verdünnung der Glycerinextrakte die Caseinaufspaltung ziemlich rasch abnimmt. Eine Gesetzmäßigkeit läßt sich aus diesem Versuch nicht ableiten.

III. Qualitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen.

2. Optimum-p_H-Kurven.

Um festzustellen, welche Proteinasen in bösartigen Tumoren vorhanden sind und weiter, um zu vergleichen, ob die Proteinasen in Tumoren die gleichen sind wie in anderen menschlichen und tierischen Geweben, wurden mit den Fermentextrakten p_H-Optimumkurven angelegt.

Als Ferment dienten sowohl die nach II., 1. gewonnenen Rohextrakte als auch durch Adsorption und Elution gereinigte Fermentlösungen, und zwar wurden Extrakte aus Carcinomen verschiedener Herkunft (Mamma, Magen), sowie einem Sarkom angewandt. Von normalen Geweben wurden Extrakte aus menschlichen Zellen (Leber, Muskulatur) sowie Extrakte aus Rindermilz benutzt.

Als Substrate kamen Casein, Gelatine, Albumin, Edestin, Glycerinextrakt-Eigeneiweiß, sowie zum Teil auch Extrakte aus menschlichen Organen zur Anwendung.

a) Optimum-p_H-Kurven mit Casein als Substrat.

Im folgenden werden zunächst Versuche besprochen, die die Wirkung von ungereinigten Carcinomextrakten gegen Casein im sauren Gebiet zeigen. Die Versuche wurden stets mit der nephelometrischen Methodik gearbeitet, da die verhältnismäßig geringen Extraktmengen allein ein Arbeiten mit einer Mikromethodik gestatten. Es konnten daher die

von *Kleinmann* und *Stern* (7)[1] mit Milzextrakten angestellten Spaltungen nach *van Slyke* mit Carcinomextrakten hier nicht verglichen werden.

Die Aziditäten wurden sämtlich mittels Essigsäure eingestellt, die Spaltzeiten lagen zwischen 15 und 24 Stunden; die Spalttemperaturen lagen zwischen 37 und 38°. Die Aziditäten ändern sich während des Versuchs praktisch nicht; im stärker sauren Gebiet genügt die Pufferung durch die stark verdünnten Eiweißlösungen vollständig.

Dagegen zeigten die nach der nephelometrischen Methode gewonnenen p_H-Optimumkurven auch von Carcinomextrakten hinsichtlich des Kathepsins genau das gleiche Verhalten, wie es von *Kleinmann*

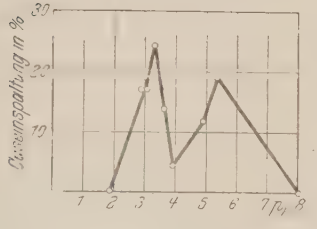


Abb. 1.
Optimum-p_H-Kurve von saurem Carcinomextrakt gegen Casein als Substrat.

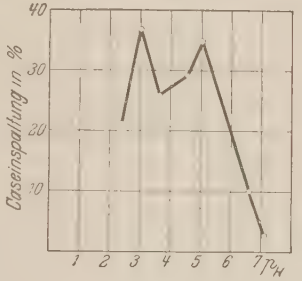


Abb. 2.
Optimum-p_H-Kurve von alkalischem Carcinomextrakt gegen Casein als Substrat.

und *Stern* mit Milzextrakten beobachtet wurde. Die folgende Abbildung, die dem Versuch 20 (Abb. 1) entspricht, zeigt mit Deutlichkeit, daß im Tumor zunächst ein bei saurer Reaktion wirksames Ferment vorhanden ist.

Dasselbe hat anscheinend zwei Optima, und zwar liegt das erste Optimum bei etwa 3,3, das zweite Optimum bei etwa 5,4. Zwischen den beiden Optima findet sich eine starke Einsenkung der Kurve bei etwa p_H 4. Dieses Verhalten ist völlig gleich dem des von *Kleinmann* und *Stern* untersuchten Milzkathepsins. Versuch 19 zeigt die gleiche Erscheinung.

Beide Extrakte stammen aus (verschiedenen) Mammacarcinomen.

Versuch 21 zeigt, daß Extrakte aus Magencarcinomen sich völlig gleichartig verhalten. Nur scheint in diesem Falle das erste Optimum bei p_H 3 mit einer Spaltung bei 14,5% niedriger zu sein als das zweite Optimum bei p_H 4,6 und 31,7%. Doch variiert die Stärke der beiden Optima sowohl bei den früher beobachteten Milzextrakten

[1] Die Literaturzusammenstellung befindet sich am Schluß der fünften Mitteilung.

wie auch jetzt bei den Carcinomextrakten je nach der durch die Versuchstechnik vorher nicht mit Sicherheit zu bestimmenden Lage des zur Spaltung gewählten Versuchs-p_H.

Auch mit Extrakten, die bei schwach lackmus-alkalischer Reaktion aus Carcinomen gewonnen wurden, ergab sich völlig das gleiche Bild. Die Abb. 2, die dem Versuch 23 entspricht, zeigt ebenfalls ein Optimum bei p_H 3,03, ein zweites bei p_H 5,03 und zwischen p_H 3 und 4 eine deutliche Einsenkung.

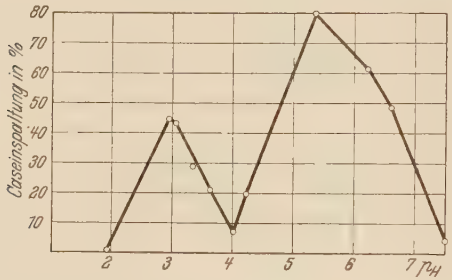


Abb. 3.
Optimum-p_H-Kurve von saurem Rindermilzextrakt gegen Casein als Substrat.

Um sicher zu sein, daß die p_H-Optimumkurve von Carcinomen die gleiche ist wie die von Rindermilzproteinase, wurden die Versuche von *Kleinmann* und *Stern* nochmals mit sauren Rohextrakten aus Rindermilz wiederholt.

Die Abb. 3 entspricht Versuch 24. Sie zeigt analogen Verlauf. Das erste Optimum liegt mit 44,7% Spaltung bei etwa p_H 3, das zweite Optimum mit 79,6% Spaltung bei p_H 5,3. Bei p_H 7,5 ist mit rund 5% praktisch keine Spaltung mehr vorhanden, während die Einsenkung zwischen den Optima bei etwa p_H 4 so tief hinab geht, daß nur 7,4% Spaltung zu beobachten sind.

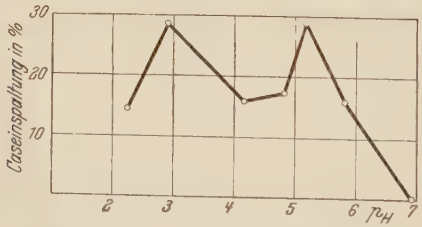


Abb. 4.
Optimum-p_H-Kurve von Extrakt aus menschlicher Leber gegen Casein als Substrat.

Schließlich wurde noch ein Extrakt aus menschlicher Leber untersucht. Auch er zeigte (s. Abb. 4, Versuch 25) das gleiche Bild.

Somit ergibt sich aus diesen Versuchen, daß in den Tumorextrakten gegen Casein Kathepsin sicher vorhanden ist. Die scheinbaren Optima dieses Kathepsins liegen bei etwa p_H 3 und 5. In Wahrheit dürfte wohl nur ein Optimum zwischen p_H 4 und 5 vorhanden sein, doch wird

dieses durch die Einsenkung der Kurve bei p_H 4 verdeckt. Diese Einsenkung wird wahrscheinlich durch die Ausflockung des Caseins während der Spaltung im isoelektrischen Gebiet und Adsorption von Ferment durch das ausflockende Substrat bedingt und ist durch die Art des Versuchsansatzes verursacht. Es muß hier auf die von *Kleinmann* und *Stern* angestellten Überlegungen verwiesen werden.

Tatsächlich war auch stets zu beobachten, daß das Minimum, wenn auch nicht genau, so doch annähernd im Gebiet der stärksten Ausflockung der Versuchsansätze gelegen war.

Was nun das Vorhandensein einer zweiten Proteinase betrifft, die im *alkalischen Gebiet* wirksam ist, so bereitete deren Identifizierung beträchtliche Schwierigkeiten.

Es wird in einer im nächsten Heft dieser Zeitschrift folgenden Arbeit von *Rona* und *Kleinmann* eingehend über das Vorhandensein einer Tryptase in Geweben berichtet werden. Es muß auf diese Darstellung verwiesen werden. Der Sachverhalt sei nur kurz zusammengefaßt. *Morse* wie auch *Dernby* und *Hedin* hatten in ihren Arbeiten stets das Vorhandensein einer im alkalischen Milieu wirksamen Tryptase in Milzextrakten behauptet. Da sie Methoden angewendet hatten, die ein Entstehen bzw. eine Zunahme von Abbauprodukten maßen, war nicht zu entscheiden, ob es sich um eine im alkalischen Milieu wirksame Proteinase, also um „Trypsin" oder um Ereptasen handelte. Von *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* (6) wurde dann ebenfalls mit einer Spaltproduktmethode (Aminostickstoffbestimmung) gezeigt, daß sich tatsächlich neben einem starken Wirkungsoptimum im sauren Gebiet auch ein kleines Optimum im alkalischen Gebiet findet. Da aber durch Adsorptionsmethoden, die eine Trennung des Kathepsins von Erepsin bewirkten, ein Eluat erhältlich war, das nur im sauren Gebiet Spaltung zeigte, lehnten die Autoren das Vorhandensein einer Proteinase im alkalischen Gebiet ab und führten die kleine Zacke in den p_H-Optimumkurven auf das Zusammenwirken einer Restwirkung des Kathepsins mit der bei p_H 8 optimalen Ereptase zurück.

Die Befunde von *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* wurden dann später von *Kleinmann* und *Stern* (7) bestätigt. Die Autoren konnten ebenso wie *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* bei Anwendung der Amino-Stickstoffbestimmung bei p_H 8 eine Zacke bzw. eine Restspaltung mit Milzextrakten darstellen, die bei Reinigung des Fermentextraktes verschwand. Bei Anwendung der nephelometrischen Methode konnte gegen verschiedene Substrate weder mit Rohextrakten noch mit Eluaten eine Spaltung im alkalischen Gebiet beobachtet werden.

Daher kamen *Kleinmann* und *Stern* zu der gleichen Ansicht wie *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* und glaubten, diese gerade durch die Anwendung der nephelometrischen Methode, die nicht Spaltprodukte, sondern das Substrat selbst zur Messung benutzte, noch erhärten zu können.

Trotzdem konnte bei weiterer Vertiefung in die Vorgänge an der Erklärung nicht mehr festgehalten werden.

Noch nicht veröffentlichte Untersuchungen von *Kleinmann* und *Scharr* an polynucleären Leucocyten ergaben zunächst mit Sicherheit das Vorhandensein von Trypsin in den sauren Glycerinextrakten der polynucleären Pferdeleucocyten. Da nun aber sicherlich in Pferdemilz erhebliche Mengen polynucleärer Leucocyten vorhanden sind, so mußte in den Milzextrakten auch Trypsin vorhanden sein.

Die genaue nochmalige Untersuchung von Milzextrakten im alkalischen Gebiet ergab dann auch die Aufklärung der Verhältnisse.

Wie in der Arbeit von *Rona* und *Kleinmann* (39) genauer gezeigt werden wird, ist in Milzextrakten (ebenso wie in Lymphdrüsenextrakten) neben reichlichen Mengen Kathepsin eine geringe Menge bei p_H etwa 8 optimal wirkende Protease vorhanden. Dieselbe läßt sich nur dann nachweisen, wenn verhältnismäßig starke Extrakte (an Kathepsin) angewandt werden. Die Trypsinmenge liegt eben oft an der Grenze der Methodik, wenn dieselbe so gehandhabt wird, daß von den Extrakten für die Kathepsinbestimmung geeignete Fermentmengen gewählt werden.

Geht man nun (aus technischen Gründen) bei der Kathepsinbestimmung mit den Fermentmengen etwas herunter — nicht so weit, daß die Messung des Kathepsins nicht mehr gut erfolgen könnte, aber doch wiederum so weit, daß die Ausschläge nicht besonders stark sind —, so fällt die Trypsinmenge aus dem Gebiet des Erkennbaren einfach aus.

Daher war in den *gereinigten* Extrakten von Milz weder mit der *van Slyke*-Methodik, noch mit der nephelometrischen in den früheren Arbeiten Trypsin gefunden worden, einfach, weil diese gereinigten Extrakte verhältnismäßig schwach waren.

Daß aber auch bei Anwendung von Rohextrakten die Anwesenheit von Trypsin nicht festgestellt wurde, hatte noch andere Gründe. Trypsin ist, wie eben dargelegt, nur bei Anwendung großer Extraktmengen wahrnehmbar. Wendet man aber bei der nephelometrischen Methodik große Extraktmengen an, arbeitet man mit Extrakten, die weniger verdünnt sind als 1 : 10 bis 1 : 20, so macht sich, worauf auf S. 120 hingewiesen, bei Zugrundelegung von Casein als Substrat leicht eine methodische Störung geltend. Sie beruht auf Ausflockung von Eiweiß bei p_H etwa 7 in den Ansätzen, das zur Analyse nur schwierig wieder in Lösung zu bringen ist. Es handelt sich hier um eine gegenseitige ausfällende Wirkung von Extrakteiweiß und Casein. Daher sind die Werte bei p_H etwa 7 oft widersprechend. Meist wurde mit Milzextrakten hier überhaupt keine Spaltung (oder nahezu keine), des öfteren aber auch eine geringe Spaltung gefunden. Die Lage des Punktes bei p_H etwa 7 ist aber im Kurvenzug entscheidend für die

Frage, ob bei p_H 8 ein zweiter Anstieg der Kurve, also ein tryptisches Optimum, vorhanden ist. Diese Frage konnte erst durch zahlreiche Wiederholungen und Anwendung verschiedener Substrate entschieden werden. Des weiteren bedingte die geringe Trypsinmenge, daß nur Casein und Gelatine als relativ leicht angreifbare Substrate, Serumeiweiß, Organeiweiß und Edestin aber keinerlei — oder nur äußerst geringe — Spaltung zeigten.

Und schließlich: Der Gehalt an Trypsin war bei verschiedenen Extrakten äußerst wechselnd.

Daß es sich sicherlich um Trypsin und nicht um Erepsin handelt, ist in der Arbeit von P. Rona und H. Kleinmann genauer dargelegt worden.

Es soll daher nur in dieser Mitteilung auf die Verhältnisse bei Tumorextrakten kurz eingegangen werden.

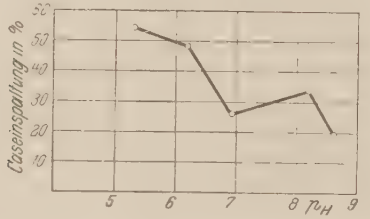


Abb. 5.
Optimum-p_H-Kurve für das alkalische Gebiet von Rindermilzextrakt gegen Casein als Substrat.

Zunächst sei als Beispiel für Milzextrakte Versuch 26 genannt, der durch Abb. 5 wiedergegeben wird. (Extrakt-Verdünnung 1 : 20.) Die Kurve zeigt mit Sicherheit das Vorhandensein einer Tryptase, macht es aber, hinsichtlich Versuchsbedingungen (Größe des Ausschlages im Hinblick auf die Extraktkonzentration, Enge des Optimums usw.) verständlich, warum bei den ursprünglichen Versuchen mit Milzextrakten kein Trypsin gefunden wurde.

Da nun Tumorextrakte weit weniger Kathepsin enthalten als Milzextrakte und an sich schon in höheren Konzentrationen verwandt werden als Milzextrakte, war es nicht wahrscheinlich, daß bei einem ähnlichen Verhältnis Kathepsin/Trypsin das tryptische Ferment mit Sicherheit in Carcinomextrakten nachgewiesen werden kann.

Hinzu kommt, daß bei dem hohen Gehalt von Myelocyten an Trypsin von vornherein in Milzextrakten, die doch gewissermaßen auch Extrakte aus Myelocyten darstellen, weit mehr Trypsin vorhanden sein muß als in anderen nicht so viel Myelocyten enthaltendem Gewebe.

Versuch 27 mit Carcinomextrakt IX zeigt, obgleich in der hohen Konzentration einer Verdünnung 1 : 5 verwendet, keinerlei Spaltung bei p_H 8,1.

Ebenso verhielten sich alle Tumorextrakte, deren Kathepsingehalt gering war, d. h. ungefähr in der Größenordnung lag, wie er zumeist bei Tumorextrakten beobachtet wurde.

Fiel aber ein Tumorextrakt an Fermentmenge (Kathepsingehalt) verhältnismäßig aus der Reihe der untersuchten heraus, so war auch eine geringe tryptische Wirkung nachweisbar.

Versuch 28, wiedergegeben durch Abb. 6, der mit dem sehr fermentreichen Extrakt X (Sarkom) angestellt wurde, zeigt das Vorhandensein einer kleinen, aber deutlichen tryptischen Zacke bei p_H 8.

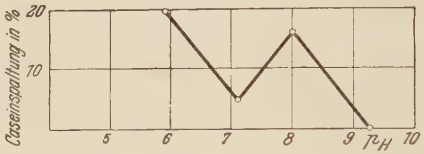


Abb. 6.
Optimum-p_H-Kurve eines Sarkomextraktes gegen Casein als Substrat.

Um dies Verhalten der Tumorextrakte nicht nur mit Milzextrakten, sondern auch mit Extrakten anderer Organe zu vergleichen, wurde eine Reihe von Versuchen über den Trypsingehalt normaler menschlicher Gewebe angestellt.

Die Versuche, die in folgender Tabelle angegeben werden, zeigen, daß, gemessen gegen Casein, die Größe der tryptischen Wirkung (unter Berücksichtigung der Extraktverdünnung) etwa der katheptischen Wirkung im Maximum parallel geht.

Tabelle.

Tryptische Spaltung durch verschiedene Organ- und Tumorextrakte.

Extrakt	Verdünnung	Spaltung (%) bei p_H 8 bis 8,1 in 24 Std.
Tumor IX	1 : 5	0
„ X	1 : 3	16
„ XI	1 : 5	0
„ XII	1 : 5	0
„ XIV	1 : 5	0
„ XV		
Menschliche Leber *O* III	1 : 5	17
„ Milz *O* V	1 : 5	31
„ Niere *O* VI	1 : 5	28
„ Haut *O* VIII	1 : 5	0
„ Leber *O* IX	1 : 10	17
„ Milz *O* X	1 : 10	15
Menschlicher Muskel *O* XIII	1 : 10	0
Rindermilz *R* Va	1 : 10	41

b) Optimum-p_H-Kurven mit Gelatine als Substrat.

Die qualitative Übereinstimmung der Optimum-p_H-Kurven von Carcinomextrakten mit Organextrakten wurde auch bei der Anwendung von Gelatine als Substrat festgestellt. Sie wird in folgenden Versuchen zunächst bei Spaltungen im sauren Gebiet gezeigt werden. Eine Schwierigkeit für die Versuche liegt darin, daß die Methodik nicht von gleicher Genauigkeit ist wie bei den anderen Substraten. Infolge der Trübungsanomalien, die bei der nephelometrischen Methode in einem Gebiet starker alkalisch als p_H 6 entstehen, wurde meist mit der auf

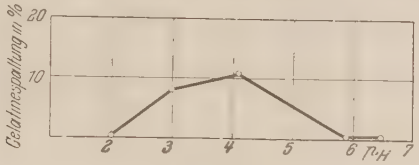


Abb. 7.
Optimum-p_H-Kurve eines unaktivierten Tumorextraktes gegen Gelatine als Substrat.

S. 121 beschriebenen Modifikation gearbeitet. Auch wurde zunächst auf Messung über p_H 8 hinaus verzichtet.

Die Aziditäten wurden mit Essigsäure bzw. Natronlauge eingestellt. Die Resultate wurden nach einer Eichkurve bei angenähert gleichem p_H ermittelt.

Die Abb. 7, die dem Versuch 29 entspricht, zeigt eine Spaltung von Gelatine mit *unaktiviertem* Carcinomextrakt. Zunächst zeigt die Kurve, daß die Spaltung gegen Gelatine sehr gering ist. Es wurde mit einer Fermentverdünnung 1 : 15 und nicht mit höheren Konzentrationen wegen der auf S. 130 angeführten Gründe gearbeitet. Bei dieser Verdünnung wurde meist überhaupt keine Spaltung gegen Gelatine gefunden. Hinsichtlich des quantitativen Verhaltens wird auf S. 191 verwiesen.

Trotz des geringen Umsatzes zeigt die Kurve ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4, aber keinerlei Spaltung mehr über p_H 6 hinaus (s. weiter unten).

Zum Vergleich mit Kathepsin aus Organen wird im Versuch 30 ein durch H_2S aktivierter Carcinomextrakt geprüft. Er zeigt (siehe Abb. 8) bei starker Aufspaltung (bis zu 70%) ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4. Bei p_H etwa 7,4 war praktisch keine Spaltung vorhanden.

Ein gleiches Verhalten zeigte ein mit H_2S aktivierter Extrakt aus einem Sarkom (s. Vers. 31). Auch hier lag das p_H-Optimum bei etwa p_H 4, während bei p_H 7,4 die Spaltung nur minimal war. Diese Kurven

zeigen, daß das p_H-Optimum des Tumorferments das nämliche ist, wie es von *Kleinmann* und *Stern* bei der Rindermilz beschrieben wurde. Zur Sicherung des Befundes wurde Rindermilzproteinase nochmals geprüft. Der Versuch 32 gibt in Abb. 9 die Bestätigung des bisher Gesagten.

Somit zeigt das Kathepsin der Tumoren die gleiche p_H-Optimumkurve gegen Gelatine wie Rindermilzproteinase. Optimum etwa p_H 4.

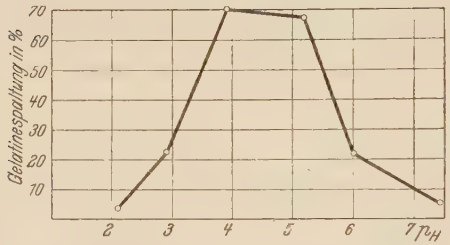


Abb. 8.
Optimum - p_H - Kurve eines mit Schwefelwasserstoff aktivierten Tumorextraktes gegen Gelatine als Substrat.

Die Frage nach einer Tryptasewirkung von Gewebsextrakten gegen Gelatine war schwierig zu entscheiden.

Denn die Gelatinemethode ist diejenige, die von allen Trübungsmethoden im alkalischen Gebiet am unzuverlässigsten ist. Dies beruht darauf, daß Gelatinelösungen unter den Versuchsbedingungen bei längerem Stehen im Brutschrank auch bei völlig sterilem Arbeiten Veränderungen erleiden, die sich bei Zusatz des Fällungsmittels ergeben.

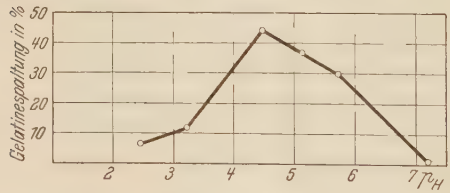


Abb. 9.
Optimum - p_H - Kurve von unaktiviertem Rindermilzextrakt gegen Gelatine als Substrat.

Es muß beim Stehen in der Wärme und alkalischer Reaktion eine Veränderung des Gelatinemoleküls eintreten. Bis zu einem gewissen Grade ist diese Spontanänderung durch Anwendung empirischer Eichkurven, die mit bekannten Gelatinemengen unter gleichen Versuchsbedingungen erhalten wurden, korrigierbar.

Versuch 33, wiedergegeben durch Abb. 10, zeigt einen Versuch über Milztryptase, der die Resultate gegen Casein hinsichtlich Lage und Größe des Optimums gut bestätigt.

Die gleichen Kurvenbilder bei beiden Substraten ergänzen sich gegenseitig und bestätigen das Vorhandensein geringer Trypsinmengen in den Milzextrakten.

Es wurden auch Tumorextrakte gegen Gelatine bei p_H 7 bis 9 untersucht.

Wie zu erwarten, wurde niemals Trypsin gefunden. Da schon gegen Casein kaum Trypsin zu finden war, so war es von vornherein unwahrscheinlich, daß Gelatine, die gegen Kathepsin (unaktiviert) weniger angreifbar ist als Casein, Trypsinwirkung erkennen lassen kann.

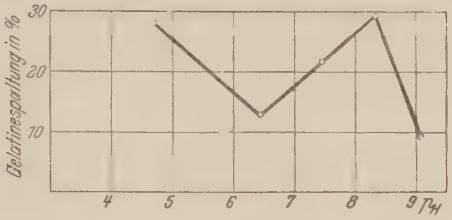


Abb. 10.
Optimum-p_H-Kurve von Rindermilzextrakt gegen Gelatine im alkalischen Gebiet.

c) Optimum-p_H-Kurven mit Serumalbumin als Substrat.

Gegen natives Eiweiß (Serumalbumin) konnte durch Carcinomextrakte zwischen p_H 2 und 6,5 und über 40 bis 70 Stunden Spaltzeit keine Spaltung beobachtet werden. Ein Vergleich dieser Extrakte mit Organextrakt ist bei obigem Substrat also nicht möglich. Da Carcinomextrakt gegen Serumeiweiß nicht aktivierbar ist, kann auch nicht die Kurve von aktiviertem Extrakt herangezogen werden (s. Vers. 35).

Die Beobachtungen an Milzextrakt stimmen im allgemeinen mit denen von *Kleinmann* und *Stern* (7) überein (s. Versuch 34, Abb. 11). Ein Maximum bei p_H 4 bis 5 ist deutlich erkennbar.

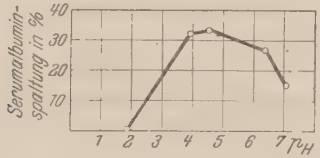


Abb. 11.
Optimum-p_H-Kurve von Rindermilzextrakt gegen Serumalbumin als Substrat.

Die Tatsache, daß Serumalbumin von Tumorextrakten nicht angegriffen wurde, während Milzproteinase dieses Substrat angreift, beruht nicht auf einem qualitativen Unterschied der verglichenen Fermente, der Unterschied ist vielmehr allein quantitativ. Denn, da Serumalbumin von Kathepsin relativ am schwersten angegriffen wird und im Tumor weniger Ferment vorhanden ist als in der Milz (siehe S. 201), so ergibt sich das Ausfallen einer Spaltung bei den Tumorextrakten zwanglos aus der geringeren vorhandenen Fermentmenge.

d) Optimum-p_H-Kurven mit Organeiweiß als Substrat.

Um festzustellen, ob Tumorextrakte vielleicht im Gegensatz zu anderen Gewebsextrakten die Eigenschaft haben, *artgleiches Eiweiß*

spezifisch anzugreifen, wurden Versuche mit menschlichem Muskel- und Lebereiweiß als Substrat angestellt. Bei allen untersuchten Aziditäten war keinerlei Angriff bemerkbar. Eine Kurve für Milzextrakte gibt Versuch 40 mit der Abb. 12 (Lebereiweiß).

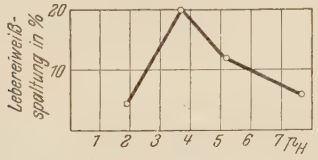


Abb. 12.
Optimum-p_H-Kurve von Rindermilzextrakt gegen Lebereiweiß als Substrat.

Das verschiedene Verhalten ergibt sich, wie bei dem vorangehenden Abschnitt c), aus den quantitativen Unterschieden. Eine besondere, leichtere Spaltbarkeit menschlichen Gewebseiweißes durch Extrakte menschlicher Tumoren ist nicht zu beobachten.

e) Eigeneiweiß der Glycerinextrakte als Substrat.

Zur Klärung der Trypsinfrage wurde die Untersuchung des Eigeneiweißes der Fermentextrakte als Substrat herangezogen. War es doch möglich, daß eventuell vorhandenes Trypsin fest an das Eigeneiweiß der Extrakte gebunden ist, so daß es bei Untersuchung durch Zusatz anderer Substrate gar nicht in Erscheinung tritt. Zu diesem Zweck wurden, wie in Kapitel II, 2 (Bestimmungsmethoden) beschrieben wurde, nur schwach verdünnte Glycerinextrakte mit Phosphatpuffer bzw. Phosphat/Säure-(Lauge-)Gemischen auf bestimmte Aziditäten eingestellt und dann 1 bis 24 Stunden der Reaktion überlassen.

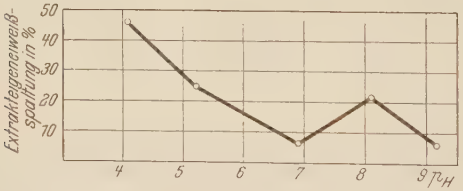


Abb. 13.
Optimum-p_H-Kurve von Tumor- (Sarkom-) Extrakt X gegen das Eigeneiweiß des Glycerinextraktes als Substrat.

Versuch 36 zeigt, was auch durch weitere Versuche bestätigt werden konnte, daß man nach einer Spaltzeit von 22 Stunden und einer Verdünnung 1 : 5 des Rindermilzextraktes eine deutliche Trypsinwirkung erhält. Die Werte bestätigen das bei Gelatine und Casein über die Tryptase der Extrakte Gesagte. Tumorextrakte liefern auch hier wegen ihrer geringeren Fermentkonzentration nach 24 Stunden eine meßbare Trypsinwirkung nur selten; als Beispiel einer solchen sei Versuch 37 mit der Abb. 13 wiedergegeben. Um sicher zu sein, daß Eigeneiweiß tatsächlich auch von Tryptase angegriffen wird,

wurden Kontrollversuche angestellt, bei denen etwas Trypsin-(Pankreas-Dispert, verdünnt 1 : 10000 bis 1 : 100000) in die Ansätze gegeben wurde. Die Kontrollen zeigten, daß das Eiweiß der Fermentextrakte leicht durch Trypsin angegriffen wird, daß also die Eigeneiweiß-Spaltversuche durchaus als beweisend anzusehen sind.

f) Optimum-p_H-Kurven mit Edestin als Substrat.

Edestin, das durch Trypsin weit schwerer angreifbar ist als Casein und Gelatine, zeigte keine Tryptasewirkung durch Organ- und Tumorextrakte, dagegen ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4 (Kathepsin). Als Beispiele für je einen Organ- und Tumorextrakt seien die Versuche 38 und 39 angeführt. Abb. 14 entspricht Versuch 39 und zeigt den Umsatz von Edestin durch Tumorextrakt.

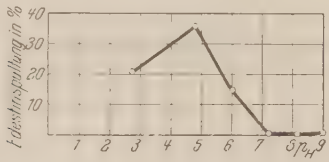


Abb. 14.
Optimum-p_H-Kurve von Tumorextrakt X gegen Edestin als Substrat.

Auch gegen Edestin zeigen somit Milz- und Tumorextrakte gleichartiges Verhalten.

Zusammenfassend darf somit gesagt werden, daß das Kathepsin der Tumoren in bezug auf die Lage des Wirkungsoptimums identisch ist mit dem Kathepsin normaler tierischer und menschlicher Organe. Nimmt man an — was als wahrscheinlich angesehen wird —, daß die Form der Casein-Optimum-p_H-Kurve durch Flockung des Substrats bzw. Adsorption des Ferments hervorgerufen wird, so besitzt das in allen Geweben vorhandene katheptische Ferment gegen die verschiedenen Substrate ein Wirkungsoptimum im Gebiet bei p_H 4 bis 5.

In bezug auf das Vorhandensein von Tryptase muß gesagt werden, daß wohl sämtliche Gewebsextrakte diese enthalten, jedoch in so geringer Menge, daß nur relativ fermentreiche Extrakte überhaupt eine tryptische Wirkung zeigen, die mit unseren Methoden meßbar ist. Die angewandten Substrate werden durch Trypsin verschieden stark angegriffen, am leichtesten Casein und Gelatine, dann folgt das Eigeneiweiß der Fermentextrakte, weit schwerer Serumeiweiß, Organeiweiß sowie Edestin. Daher ließ sich eine tryptische Wirkung nur mit stark konzentrierten Milzextrakten und einzelnen Gewebsextrakten erkennen, die an sich fermentärmeren Extrakte aus Tumoren und nichtparenchymatösen Organen zeigten Tryptasewirkung nur in Ausnahmefällen.

3. Aktivierungsverhalten.

a) Abhängigkeit der durch Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff bedingten Aktivierung vom Substrat.

Im folgenden Abschnitt wird das Verhalten von Tumorextrakten bei Zusatz von Cyanwasserstoff und Schwefelwasserstoff gegen das Verhalten von Extrakten normaler tierischer und menschlicher Organe verglichen.

Wie bekannt, konnte *Waldschmidt-Leitz* (4) zeigen, daß die Gewebsproteinase sowohl durch Schwefelwasserstoff als auch durch Blausäure aktivierbar ist und daß dieses Verhalten dem von *Grassmann* und *Dykerhoff* (19), (22) bei Hefeproteinase gezeigten entspricht. Das gleiche gilt für Papain und Malzproteinase. Außerdem konnte *Waldschmidt-Leitz* (4) zeigen, daß das Enzym in den Organauszügen von einem natürlichen Aktivator (Zookinase) begleitet wird, der anscheinend sich bei der beginnenden Autolyse der Organe bildet und durch präparative Methoden abgetrennt werden konnte. Diese Aktivatoren haben nach der Darstellung von *Grassmann* die Bedeutung von Hilfsstoffen, die den Spezifitätsbereich des Enzyms erweitern. Natürliche Proteine werden nur durch das natürliche Enzym angegriffen, während es gewisse Protein-Abbauprodukte auch schon ohne Aktivator zu zerlegen vermag.

Waldschmidt-Leitz (23, 24) und Mitarbeiter konnten inzwischen die Identität ihrer Zookinase mit Glutathion nachweisen. Auch im Falle der Hefeproteinase soll die Aktivierung nach *Grassmann* mindestens teilweise durch Glutathion bewirkt werden.

Nach der Beobachtung von *Waldschmidt-Leitz* soll nun die Aktivierung der Zellproteinase durch natürliche Aktivatoren nicht nur bei der Autolyse eintreten, sondern auch bei der Bildung und Reifung bösartiger Geschwülste (4), (24).

Es ist schon in Abschnitt I darauf hingewiesen worden, daß *Waldschmidt-Leitz* eine Steigerung des Umsatzes des Eiweißes in Tumoren mit Hemmung der Zellatmung in inneren Zusammenhang bringt. Soll doch das Überwiegen der reduzierten Thiosysteme, das eine Folge des Überwiegens an oxybiontischem Stoffwechsel darstellt, eine erhöhte Aktivität der Gewebsprotease bedingen.

Aus diesen Gründen ist das Verhalten des Tumorkathepsins gegen Aktivatoren von ganz besonderem Interesse. Es ist daher eingehend bearbeitet worden. Ihre Ergänzung finden die vorliegenden Versuche noch in dem Abschnitt IV, in dem versucht wurde, das Verhältnis der Mengen des noch aktivierbaren zum vollaktivierten Ferment quantitativ zu bestimmen.

Bereits von *Kleinmann* und *Stern* (7) waren Versuche über die Aktivierbarkeit der Rindermilzproteinase mit Schwefelwasserstoff

und Cyanwasserstoff mittels der nephelometrischen Methode angestellt worden. Und zwar waren sowohl rohe als auch gereinigte Fermentlösungen zur Anwendung gekommen.

Kleinmann und *Stern* hatten gefunden, daß Schwefelwasserstoff alle Kathepsinlösungen, rohe und gereinigte, gegen Gelatine deutlich aktivierte. Gegen Casein erschien die Wirkung des Schwefelwasserstoffs geringfügig, so daß die Verfasser darauf hinwiesen, daß die Wirkung gegen Gelatine deutlicher sei als gegen Casein. Doch glaubten sie eine geringe Wirkungssteigerung gegen Casein (etwa 5% Spaltungszunahme) auch noch als eine Wirkung des Schwefelwasserstoffs auffassen zu dürfen. Die jetzt vorliegenden Erfahrungen zeigen, daß die Spaltungszunahme beim Casein, die innerhalb des Fehlergebiets liegt, nicht als Aktivierung gedeutet werden darf.

Mit Cyanwasserstoff fanden die Autoren bei Rindermilzextrakten deutliche Aktivierung gegen Gelatine und Casein. Diese Befunde müssen durch die zahlreichen vorliegenden Nachuntersuchungen dahin richtiggestellt werden, daß das Milzkathepsin in Rohextrakten nur gegen Gelatine aktivierbar ist.

Gereinigte Kathepsinlösungen (Eluate) ließen sich nach *Kleinmann* und *Stern* niemals irgendwie durch Cyanwasserstoff aktivieren.

Im folgenden wird nun zunächst die Frage untersucht, ob Kathepsinlösungen sowohl aus Tumoren als auch aus normalen Organen gleichmäßig gegen verschiedene Substrate aktivierbar sind oder ob sich im Verhalten gegen die verschiedenen Substrate Unterschiede zwischen den verschieden verwandten Fermentextrakten ergeben. Als Substrat wurde Casein, Gelatine, Serumalbumin und menschliches Organeiweiß verwandt, sowie der Vollständigkeit halber auch Extrakt-Eigeneiweiß und Edestin.

α) Aktivierung gegen Casein als Substrat.

Zunächst sei die Wirkung von Schwefelwasserstoff wie auch von Cyanwasserstoff gegen Casein dargestellt.

Der Versuch 41 zeigt die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf Extrakte von Rindermilz bei Einwirkung auf Casein. Hinsichtlich der Technik, der Aktivierung und der Menge des verwandten Schwefelwasserstoffs muß auf den experimentellen Teil sowie auf die Versuche S. 157ff. verwiesen werden. Es sei nur angeführt, daß mittels Schwefelwasserstoff maximal aktiviert wurde und daß die Spaltung innerhalb 24 Stunden bei optimalem p_H erfolgte. Als Optimum wurde bei Casein das scheinbare erste Optimum bei p_H 3 gewählt. Später ausgeführte Versuche (s. S. 159) zeigen, daß durch die Aktivierung selbst die Lage des p_H-Optimums nicht verschoben wird.

Der angeführte Versuch zeigt, daß gegen Casein keinerlei Aktivierung feststellbar war. Die Spaltung nach der Aktivierung betrug im Durchschnitt zweier Parallelversuche 38,4 gegen 38,1% ohne Aktivierung.

Der folgende Versuch 42 zeigt, daß eine Wirkung von Cyanwasserstoff bei der Spaltung von Casein durch Rindermilzproteinase nicht vorhanden ist. Es wurde eine Menge von 0,5 mg HCN pro Kubikzentimeter der zum Versuch verdünnten Fermentlösung verwandt, eine Menge, die zwar, wie spätere Versuche zeigen werden, an anderem Substrat keine maximale, aber sehr deutliche Aktivierung erkennen läßt. Versuch 43 mit steigenden HCN-Mengen (bis zu 1,5 mg HCN/ccm Extraktverdünnung) zeigt, daß auch große HCN-Mengen keine Aktivierung gegen Casein als Substrat bewirken können. Die Versuche zeigen somit, daß ebenso wie Schwefelwasserstoff auch Cyanwasserstoff keinerlei aktivierenden Einfluß auf die Milzproteinase hat, wenn sie gegen Casein wirkt. Eher ist eine geringe Hemmung festzustellen.

Nunmehr wurde Carcinomextrakt sowohl mit Schwefelwasserstoff als auch mit Cyanwasserstoff aktiviert und gegen Casein angesetzt. Der Versuch 44 zeigt, daß Carcinomextrakt sich genau so wie Milzextrakt verhielt. Schwefelwasserstoff hatte keinerlei aktivierende Wirkung, betrug doch die Spaltung ohne Schwefelwasserstoff rund 21%, mit Schwefelwasserstoff rund 19%. Ebenso verhielt sich Cyanwasserstoff (s. Versuch 45). Trotzdem eine sehr große Menge Cyanwasserstoff angewandt wurde (3 mg pro Kubikzentimeter Fermentverdünnung), war der Umsatz mit Cyanwasserstoff eher um ein geringes kleiner als ohne Cyanwasserstoff.

β) Aktivierung bei Gelatine als Substrat.

Ein ganz anderes Bild zeigt sich hinsichtlich des Einflusses der Aktivatoren auf die Fermentlösungen, wenn man diesen Gelatine als Substrat vorlegt. Nunmehr beobachtet man sowohl durch Schwefelwasserstoff als auch durch Cyanwasserstoff eine erhebliche Steigerung der proteolytischen Wirkung. Die Wirkung des Cyanwasserstoffs scheint nicht ganz so stark zu sein wie die des Schwefelwasserstoffs. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß infolge technischer Gründe es vermieden wurde, mit größeren Cyanwasserstoffmengen zu arbeiten, so daß manche Aktivierungen sich vielleicht noch stärker hätten darstellen lassen. Hinsichtlich dieser Frage muß auf die Versuche S. 158 hingewiesen werden.

Zunächst wurden wieder Rindermilzextrakte mit Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff aktiviert. Versuch 50 zeigt mit Schwefelwasserstoff eine Spaltung von rund 90% gegen eine Spaltung von rund 35% ohne Schwefelwasserstoff. Ein Extrakt aus menschlicher Milz, der bei einer Verdünnung von 1 : 100 überhaupt Gelatine nicht

angriff, zeigt mit Schwefelwasserstoff eine Spaltung von 38%, mit Cyanwasserstoff eine solche von 7% (Vers. 51). Da in diesem Versuch eine relativ große Menge Cyanwasserstoff zur Aktivierung benutzt wurde (etwa 1,5 mg Cyanwasserstoff pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung), so geht aus dem Versuch auch gleichfalls hervor, daß die Aktivierung durch Cyanwasserstoff, wenn auch deutlich, so doch merkbar geringer ist als durch Schwefelwasserstoff.

Einen zweiten Versuch mit Extrakten menschlicher Organe zeigt Versuch 52. Es wurde ein Extrakt aus menschlichem Gehirn untersucht, der an sich keine Spaltung gegen Gelatine aufwies. Mit Schwefelwasserstoff wurde eine Spaltung von 18% erreicht.

Nunmehr wurden auch Carcinomextrakte mit Schwefelwasserstoff gegen Gelatine aktiviert. Während die Extrakte an sich gar keine oder keine nennenswerte Spaltung zeigten, betrugen die Umsätze nach der Aktivierung 23 bzw. 53% (s. Versuche 53 und 54).

Versuch 55 zeigt schließlich einen Versuch zur Aktivierung von Carcinomextrakt mit Schwefelwasserstoff oder Cyanwasserstoff. Während durch Schwefelwasserstoff eine Spaltung erzielbar wurde, reichte die Wirkungssteigerung durch Cyanwasserstoff nicht aus, um den an sich unwirksamen Extrakt sichtbar zu verstärken.

Um sicher zu sein, daß es sich bei der Schwefelwasserstoffaktivierung tatsächlich um den Vorgang einer Fermentaktivierung handelt und daß nicht etwa unmittelbare chemische Einwirkungen des Schwefelwasserstoffs auf das Substrat, d. h. die Gelatine, stattfinden, wurde ein Aktivierungsversuch derart angestellt, daß der Versuchsansatz der gleiche wie der bei den vorangehend beschriebenen Versuchen war, als Ferment aber abgekochter Milzextrakt zur Anwendung gelangte.

Versuch 56 zeigt, daß Gelatine weder durch Schwefelwasserstoff allein, noch durch Schwefelwasserstoff mit Fermentabkochung angegriffen wurde.

Somit kann über die Versuche mit Gelatine gesagt werden, daß bei sichtbaren Umsätzen durch unaktivierte Extrakte diese durch Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff verstärkt werden. Da Cyanwasserstoff unter den Versuchsbedingungen schwächer wirkte als Schwefelwasserstoff, ließen sich Extrakte aus menschlichen Organen, die an sich Gelatine unter den Versuchsbedingungen nicht angriffen, wohl durch Schwefelwasserstoff, nicht aber immer genügend oder nur gerade merkbar durch Cyanwasserstoff aktivieren. Ebenso verhielten sich Carcinomextrakte. Da dieselben an sich Gelatine meist nicht oder nur in einer Menge umsetzten, die noch in die Fehlergrenze der Methode fällt, so ließ sich eine Aktivatorwirkung meist nur mit Schwefelwasserstoff feststellen. Cyanwasserstoff reichte nur in einzelnen Fällen aus, um sichtbare Spaltung zu erreichen.

Im Prinzip war aber das Verhalten der Tumorextrakte das gleiche wie das bei anderen Organen.

Alle bisherigen Angaben beziehen sich auf Kathepsin. Gewebstryptase war durch H_2S nicht aktivierbar (s. Vers. 70).

γ) Aktivierung bei Serumalbumin und Organeiweiß als Substrate.

Nunmehr wird die Wirkung der Aktivatoren auf Kathepsin gegen *Serumalbumin* geprüft.

Die Versuche 46 und 47 zeigen zunächst wieder die Wirkung von Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff bei Anwendung von Milzextrakten. Die Umsätze mit Schwefelwasserstoff (etwa 20,5%), ohne Schwefelwasserstoff (etwa 22%) und mit Cyanwasserstoff (etwa 20%) ohne Cyanwasserstoff (etwa 22%) zeigen, daß bei der Milzproteinase beide Aktivatoren ohne jede Wirkung sind.

Nunmehr wurden gleiche Versuche mit Carcinomextrakt angestellt. Die im Verhältnis zur Milz geringeren Fermentmengen der Carcinome bedingten, daß Carcinomextrakte an sich Serumalbumin nicht angriffen, trotzdem Spaltzeiten bis zu 44 Stunden angewandt wurden. Die Versuche 48 und 49 zeigen, daß auch nach Einwirkung von Schwefelwasserstoff oder Cyanwasserstoff kein Umsatz gegen Serumalbumin erreicht wurde.

Ebenso wie bei Casein sind Organ- und Carcinomrohextrakte gegen Serumalbumin durch Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff nicht aktivierbar. Bei Versuchen mit verschiedenen Extrakten wurden die Extraktverdünnung, die Aktivatormenge, die Azidität und die Spaltzeit variiert. In keinem Falle konnte eine Wirkungssteigerung beobachtet werden. Bei Milzextrakt ist dies ganz eindeutig zu erkennen. Bei Carcinomextrakten, die Serumalbumin nicht oder nur sehr wenig (innerhalb der Fehlergrenze) angreifen, konnte auch mit den angewandten Aktivatoren eine Aufspaltung nicht erzielt werden. Man darf wohl vermuten, daß auch hier eine Verstärkung nicht stattfindet. Ebenso war gegen das Eiweiß menschlicher Organe (Leber und Muskel) eine Wirkungssteigerung nicht zu erhalten. Tumorextrakte, die dieses Eiweiß nicht oder nur sehr gering angreifen, zeigten sich auch mit den beiden Aktivatoren Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff nicht verstärkt. Von einer Aktivierbarkeit des Tumorkathepsins gegen menschliches Organeiweiß dürfte also keine Rede sein.

δ) Aktivierung gegen Edestin und Extrakteiweiß als Substrat.

Gegen die Substrate Edestin und Eigeneiweiß der Glycerinextrakte war sowohl durch Schwefelwasserstoff als auch durch Cyanwasserstoff eine Steigerung der Proteolyse nicht zu beobachten. Wie der Versuch 68

z. B. darlegt, zeigten sämtliche Spaltansätze mit Edestin als Substrat und Milzextrakt als Ferment Spaltwerte zwischen 52 und 54,5% sowohl mit als auch ohne Schwefelwasserstoff. Das galt bei p_H 4 also für Kathepsin. Tryptische Spaltung bei p_H 8, welche gegen Edestin nicht meßbar war, konnte auch durch Schwefelwasserstoff nicht zur Sichtbarkeit gebracht werden.

Besonders wichtig erschien es, Versuche über eine Wirkungssteigerung des Ferments (Kathepsin) gegen das Eiweiß seines Glycerinextraktes anzustellen. Hierbei zeigte sich eine Schwierigkeit. Behandelt man nämlich den Glycerinextrakt unverdünnt oder sehr schwach verdünnt mit Schwefelwasserstoff, so erhält man Trübungen, die mehr oder weniger dunkel gefärbt sind und wohl Metallsulfide darstellen, welche die nephelometrische Analyse verfälschen würden. Die Extrakte müssen daher stärker verdünnt werden (1 : 5 bis 1 : 10), dann sind diese Trübungen und Verfärbungen weniger intensiv und für die Analyse nicht mehr wesentlich störend. Der Versuch 69 zeigt nun als Beispiel, daß bei p_H 4,3 eine Wirkungssteigerung gegen das Extrakteiweiß nicht stattfindet. Die Spaltwerte liegen eher etwas niedriger als bei den Ansätzen ohne Schwefelwasserstoff. Das gleiche gilt auch bei p_H 8. Es scheint also, daß das tryptische Ferment gegen die von uns benutzten Substrate überhaupt nicht aktivierbar ist. Tumorextrakte zeigen gleichfalls bei beiden p_H keinerlei Aktivierung sowohl durch Schwefelwasserstoff als auch durch Cyanwasserstoff.

Zusammenfassend ist über die Wirkung von Cyanwasserstoff und Schwefelwasserstoff auf Kathepsin gegenüber verschiedenen Substraten zu sagen, daß alle Extrakte, seien sie aus Tumoren, seien sie aus normalen menschlichen oder tierischen Organen gewonnen, sich gleichartig verhielten, d. h. eine Aktivierung war niemals gegen Casein, Albumin, Edestin, Organ- und Extrakteiweiß feststellbar. Die Aktivierbarkeit des Ferments trat überhaupt nur in Erscheinung, wenn es gegen Gelatine wirkte. Dann war stets bei beiden Aktivatoren (H_2S und HCN) eine Wirkung nachweisbar, und das Verhalten des Ferments in verschiedenen Extrakten war gleichartig.

Alkalische Glycerinextrakte ließen sich von Schwefelwasserstoff und Blausäure gleichfalls gegen Gelatine aktivieren (s. z. B. Versuch 57). Sie unterscheiden sich somit nicht von den sauren Glycerinextrakten.

b) Abhängigkeit der Aktivierung von den Versuchsbedingungen.

1. Einfluß der Aktivatorkonzentration.

Um stets maximale Aktivierungen zu erlangen, kann entweder Schwefelwasserstoff in die Fermentlösung eingeleitet werden oder Schwefelwasserstoffwasser zu ihr zugegeben werden. Dieses letztere Verfahren erwies sich als das methodisch bessere. Das Schwefelwasser-

stoffwassser wurde hergestellt durch ein- bis zweistündiges Einleiten von Schwefelwasserstoff in destilliertes Wasser, so daß dieses praktisch gesättigt wird. Der Gehalt an H_2S wurde jodometrisch bestimmt und zu 1 bis 2 mg pro Kubikzentimeter (meist 1,5 bis 1,7 mg) gefunden.

Eine bestimmte Menge Schwefelwasserstoffwasser (meist ein Fünftel des endgültigen Extraktverdünnungsvolumens) wurde zu den Extrakten gegeben, die dann mit Wasser auf ihre Endverdünnung gebracht wurden. Man erkennt aus der Kurve, daß ein Zehntel des Volumens der Extraktverdünnung (= 20 mg pro 100 ccm Verdünnung) an Schwefelwasserstoffwasser (gesättigt) genügt, um das Ferment für die betreffende Verdünnung voll zu aktivieren.

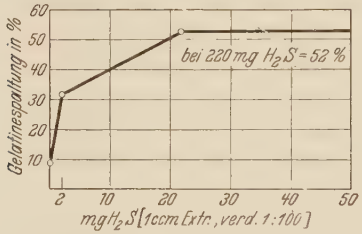


Abb. 15.
Einfluß der Schwefelwasserstoffmenge auf die Gelatinespaltung durch Rindermilzextrakt.

Sicherheitshalber wurde aber bei den Aktivierungsversuchen mit der doppelten Menge gearbeitet. Bei einem Gehalt von 20% H_2S-Wasser in der Extraktverdünnung ist diese sicher voll aktiviert. Das zeigt der Versuch 58. Die Schwefelwasserstoffmenge wurde weitgehend variiert, zum Teil bestand die Extraktverdünnung zu 99% aus Schwefelwasserstoffwasser, was einem Einleiten von Schwefelwasserstoff nahe kommen mag. Bei den Aktivierungsversuchen zeigte sich bei Einleiten von Schwefelwasserstoff oder Zugabe einer wässerigen Lösung zu den Glycerinextrakten kein Unterschied in der Wirkung.

Die Aktivierungsversuche mit *Blausäure* wurden so ausgeführt, daß zu den halben Fermentverdünnungen bestimmte Mengen neutralisierter Cyannatriumlösung gegeben werden und diese dann auf die volle gewünschte Extraktverdünnung mit Wasser aufgefüllt wurden. Im allgemeinen wurde die Zugabe so eingerichtet, daß die endgültige Extraktverdünnung 1 mg freie Blausäure pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung enthielt. Die Neutralisation des Natriumcyanids (das in einer wässerigen Lösung von 1,2% zur Anwendung gelangte) geschah mittels n Essigsäure gegen Methylrot als Indikator. 1,4 ccm obiger Natriumcyanidlösung geben nach der Neutralisation in 1 ccm Extraktendverdünnung 1 : 10 etwa 1 mg HCN. In Fällen, in denen die Farbe der Extrakte diejenige des Indikators überdeckt, wurde die Menge der Neutralisierungssäure vorher ohne Ferment ausprobiert.

Welche Wirkung wechselnde Blausäuremengen auf die Extrakte ausüben, zeigen folgende Versuche.

Versuch 59 zeigt z. B., daß mit steigenden Cyanwasserstoffmengen die Aktivierungswirkung gegen Gelatine zunimmt. Eine HCN-Menge von 0.5 mg pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung vermehrte den Gelatineabbau um rund 30%, ein Zusatz von 1,5 mg HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung um rund 60%. Da 1 mg HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung starke Aktivierung zeigte, ein Arbeiten mit größeren Mengen Cyanwasserstoffmengen bei der sauren Reaktion der Ansätze recht unangenehm war, wurde mit der genannten Menge gearbeitet und auf maximale Aktivierung verzichtet.

Zur Prüfung von Carcinomextrakten auf Cyanwasserstoffaktivierbarkeit gegen Gelatine wurde aber bis zu Mengen von 3 mg pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung hinaufgegangen. Von sechs Extrakten zeigten zwei hierbei eine geringe Spaltung (s. Versuch 60).

2. Abhängigkeit der Form der Aziditäts-p_H-Kurven von der Aktivierung.

Eine Anzahl Versuche bestätigten, daß die optimalen Spaltwerte der aktivierten Extrakte im gleichen p_H-Gebiet liegen wie die der unaktivierten. Es besteht Analogie zwischen unaktivierten und aktivierten Extrakten. Einem Ansteigen der Kurve des ersteren entspricht ein entsprechend stärkeres Ansteigen des letzteren. Bei Tumorextrakten und solchen Organextrakten, die gleichfalls Gelatine nur schwach angreifen, sind Optimum-p_H-Kurven bei diesem Substrat überhaupt nur in aktiviertem Zustand erzielbar.

Ein derartiger Versuch mit einem Tumorextrakt ist in Versuch 61 wiedergegeben, der den ansteigenden Ast einer Milzextrakt-Gelatine-Kurve mit aktiviertem und nichtaktiviertem Ferment zeigt.

3. Einfluß der Inkubationszeit.

Im folgenden wird ein Versuch wiedergegeben, der zeigt, daß eine Inkubationszeit von 60 Minuten auf das System Schwefelwasserstoff—Glycerinextrakt vor der Zugabe zu den Ansätzen keine anderen Spaltresultate erkennen ließ wie die Ansätze mit Aktivator-Fermentmischung ohne Inkubationszeit (s. Versuch 62). Für Cyanwasserstoff zeigt Versuch 63 das gleiche.

4. Einfluß der Fermentkonzentration. (Extraktverdünnung.)

Bei der Aktivierung verschieden stark verdünnter Organextrakte zeigte sich die interessante Erscheinung, daß die Aktivierung mit zunehmender Extraktverdünnung zunimmt.

Wie bei den Versuchen im Abschnitt IV, die die quantitative Auswertung der verschiedenen Extrakte behandeln, näher gezeigt werden wird, werden bei Anwendung der *van Slyke*-Methodik, für die z. B. Milzextrakte in einer Verdünnung 1 : 2 angewendet werden, bei maximaler Aktivierung Wirkungssteigerungen um etwa das zwei- bis dreifache beobachtet.

Wird aber der Extrakt vor der Aktivierung stärker verdünnt, so ist die Wirkungssteigerung durch Schwefelwasserstoff eine ungleich größere. So gelingt es, selbst mit Extrakten, die 1 : 1000 und noch mehr verdünnt sind, durch Schwefelwasserstoffzugabe Gelatinespaltungen von 20% zu erhalten. Unter Berücksichtigung der Verdünnung entsprach dies einer Aktivierung um etwa das 40fache. Beispiele dafür geben die Versuche 64 und 65.

Es ist schwer, genau zahlenmäßig den Gang dieser Aktivierungszunahme zu verfolgen. Denn, wenn Spaltzeit und Substratmenge festliegen, werden Ansätze, die von unaktiviertem Extrakt in genügender Menge aufgespalten werden, durch den aktivierten völlig aufgespalten, während mit den Extraktverdünnungen, mit denen aktiviert ein gut meßbarer Umsatz erzielt wird, unaktiviert kein Umsatz erhalten wird.

Es bleibt zum Vergleich aktivierter und unaktivierter Fermentmengen nichts übrig als die stärker wirkenden aktivierten Extrakte entsprechend zu verdünnen, die Verdünnung zu berücksichtigen und sie proportional in die Rechnung eingehen zu lassen.

Würde man aber bei diesem Vorgehen zwei verschiedene Extrakte mit verschiedenem Fermentgehalt hinsichtlich ihres Gehalts an aktiviertem und unaktiviertem Ferment vergleichen wollen, so müßte man infolge ihres verschiedenen Fermentgehalts auch verschiedene Verdünnungen anwenden, die nunmehr auch verschieden starke Aktivierung erfahren.

Welche Schwierigkeiten dieses Verhalten der Beurteilung der in Extrakten vorhandenen aktivierten und unaktivierten Fermentmengen bzw. der Mengenfeststellung des Ferments überhaupt bereitet, geht aus folgender Überlegung hervor.

Die einfachste Form zu beurteilen, um das wievielfache eine Fermentlösung aktivierbar ist, wäre eine Spaltung mit dem nativen wie dem aktivierten Extrakt auszuführen. Hierbei ergäbe sich z. B. bei der Methodik nach *van Slyke* eine Verdoppelung des Umsatzes. Hieraus könnte der Schluß gezogen werden, die Fermentwirkung sei durch Aktivierung um 100% zu steigern. Dieses Verfahren ist aber unkorrekt, denn die Umsätze sind nicht proportional den Fermentmengen, besonders nicht bei einem derartigen Versuch, in dem ein Punkt im

Kurvenbeginn mit einem Punkt am Kurvenende entsprechend geringem und großem Umsatz verglichen wird.

Richtiger ist es, den aktivierten Extrakt so zu verdünnen, daß er den gleichen Umsatz ergibt wie der unaktivierte. Wäre im Beispiel hierzu eine dreifache Verdünnung notwendig, so hätten wir eine Wirkungssteigerung um 300%, anstatt von 100% beim ersten Verfahren. Dieser Unterschied würde, abgesehen von der Ausschaltung des genannten Fehlers, schon dadurch bedingt werden, daß der Extrakt verdünnt stärker aktiviert wird, als unverdünnt. Aber auch diese Angabe ist unrichtig, denn, gebrauchen wir eine Methodik, die empfindlicher ist als die *van Slyke*-Methode, z. B. die nephelometrische, so ergäbe die Anwendung geringer Fermentmengen, d. h. stärker verdünnter Extrakte, eine Aktivierung von vielleicht 4000%. Jedoch auch dieses Ergebnis wäre nicht zuverlässig, da wir nicht sicher sind, auch bei diesen Verdünnungen maximal aktiviert zu haben. Was für diesen Vergleich aktivierten und unaktivierten Ferments gesagt ist, gilt für die Extraktauswertung überhaupt. Da sie für maximal aktivierte Extrakte vorgeschrieben ist, bezieht sie sich einmal auf eine bestimmte Methode und innerhalb derselben immer auf die gleiche Extraktverdünnung. Sie versagt, wo es sich um den Vergleich verschieden starker Extrakte handelt.

Diese Überlegung zeigt, wie außerordentlich vorsichtig man bei jeder Angabe über den Fermentgehalt von Extrakten verschiedener Herkunft sein muß und welche Schwierigkeiten der Beurteilung der Aktivierungsform eines Ferments (und gar in der Zelle) entgegenstehen.

Um unsere Tumorextrakte mit anderen Organextrakten vergleichen zu können, müßte der Weg gewählt werden, die Vergleichsextrakte bei ungefähr gleicher Verdünnung zu aktivieren wie die Tumorextrakte. Den beiden Extrakten, die dann ganz verschiedene Wirkungsstärken hätten und die mit gleicher Methodik unmittelbar nicht mehr vergleichbar wären, müßten dann entsprechend den Fermentmengen verschiedene Substratmengen vorgelegt werden, so daß annähernd gleiche prozentuale Umsätze resultieren. Die höher an Substrat konzentrierten Systeme müssen dann durch Verdünnen auf die Substratkonzentration, die zur Analyse geeignet ist, gebracht werden.

Dieses Vorgehen hat den Fehler, daß die x-fache Fermentmenge nicht die x-fache Substratmenge umzusetzen braucht. Doch muß dieser Fehler als der relativ kleinste in Kauf genommen werden. Für unsere Aufgabe könnte die Auswertung nun vereinfacht werden, wenn nachweisbar wäre, daß ein Fermentextrakt in der Verdünnung, in der ein Tumorextrakt untersucht wird, praktisch maximal aktiviert ist, so daß eine weitere Verdünnung der Extrakte bei den quantitativen Vergleichen keine Rolle mehr spielt.

Die Frage, ob bei den angewandten Extraktverdünnungen (1 : 25 bis 1 : 50) vollkommen aktivierte Extrakte benutzt wurden, konnte auf Grund der eben dargelegten Versuchsanordnung wie folgt geprüft werden.

Ein Milzextrakt (*R* IIIa, s. Versuch 66, wurde unaktiviert und aktiviert bei optimalem p_H (p_H 4) gegen Gelatine ausgewertet. Er zeigt unaktiviert in einer Verdünnung 1 : 25 einen Umsatz von 25% Gelatine und aktiviert bei einer Verdünnung von 1 : 1200 einen Umsatz von 20%. Unter Annahme von Proportionalität zwischen Fermentmenge und Wirkung entspräche ein Umsatz von 25% (aktiviert) einer Verdünnung 1 : 900. Das heißt der Extrakt hat durch die Aktivierung eine Wirkungssteigerung *um das 36fache erfahren.* Und zwar erfolgte die Wirkungssteigerung bei Aktivierung einer Verdünnung von *1 : 1200.* Es wurde nun versucht, den Extrakt bei höherer Konzentration zu aktivieren und ihn dann gegen ein höher konzentriertes Substrat wirken zu lassen. Das Substrat wurde dann zur Analyse wieder entsprechend verdünnt. Versuch 67 zeigt, daß bei Anwendung eines Extraktes von 1 : 50 eine 20%ige Gelatinelösung nötig war, um einen Umsatz von 22% zu erzielen. Unter der Annahme einer Proportionalität entspräche die Spaltung der 20%igen Gelatinelösung durch die Verdünnung 1 : 50 der Spaltung der üblichen Gelatinelösung (1%) durch eine Fermentverdünnung 1 : 1000. Die Aktivierung der Extraktverdünnung *1 : 50* durch Schwefelwasserstoff wäre also *das 40fache.*

Wenn auch die Voraussetzungen sicher nicht absolut stimmen, so zeigt der Versuch doch, daß bei einer Verdünnung des Ferments 1 : 50 die Aktivierung in der gleichen Größenordnung lag wie bei der Verdünnung 1 : 1200. Aus technischen Gründen konnte mit der Fermentkonzentration (und auch mit der Gelatinekonzentration) nicht höher gegangen werden. Doch genügt das Ergebnis, um darzustellen, daß bei Anwendung der nephelometrischen Methode im Gegensatz zu den Arbeiten nach der *van Slyke*-Methode (*Waldschmidt-Leitz* und Mitarbeiter) bei dem Vergleich der verschiedenen Extrakte, also beim Arbeiten mit Extraktverdünnungen von etwa 1 : 30 bis 1 : 60, mit praktisch wenigstens annähernd vollaktivierten Extrakten gearbeitet wurde[1].

Worauf die Erscheinung der verschieden starken Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf die verschieden stark verdünnten Extrakte beruht, ist nicht zu sagen. Eine unzureichende Menge des Aktivators kann nicht in Frage kommen, da ja Schwefelwasserstoff durch die Lösungen durchgeleitet werden kann. Auch Glyceringehalt oder Vis-

[1] Es konnten somit die Auswertungen durch Vergleich verschieden stark verdünnter Extrakte vorgenommen werden, worauf im quantitativen Teil noch genauer eingegangen werden wird.

kosität können von einer gewissen Verdünnungsgrenze ab keine Rolle mehr spielen. Es kann hier nur an die Beobachtungen erinnert werden [*P. Rona* und *H. Kleinmann* (33)], daß die Stabilität von Fermentlösungen mit der Verdünnung variiert. So kann nur der allgemeine und wenig aufklärende Begriff des „kolloiden Zustandes" als Erklärungsprinzip für dieses Verhalten der Fermentextrakte herangezogen werden.

Versuchsprotokolle.

p_H-Optimumkurven mit Casein als Substrat.

Versuch 19 (Protokoll 155).

Optimum-p_H-Kurve von Carcinomextrakt VI (Mamma) verdünnt 1 : 15, 20 Stunden Spaltzeit.

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift für Caseinansätze wurden 12 ccm Caseinlösung (0,25 %ig) mit verschiedenen Mengen Essigsäure (vgl. folgende Tabelle) versetzt (zur Einstellung der p_H) und mit Wasser auf ein Volumen von 46 ccm gebracht, 10 ccm werden davon entnommen (zweimal 4,5 ccm als Nullabnahmen) und zu dem restlichen Teil des Ansatzes 4 ccm der obigen wässerigen Fermentverdünnung gegeben.

Nach fixierter Zeit wurden die Ansätze einer 20stündigen Einwirkung bei 37° unterworfen und dann Abnahmen gemacht, die ebenso wie die mit der aufbewahrten Fermentlösung zu 5 ccm ergänzten Nullabnahmen mit Natronlauge (s. Tabelle) neutralisiert und mit Wasser auf 10 ccm ergänzt wurden. Nun wurde mit 5 ccm m/15 Phosphatvorlagepuffer (p_H 7,8) und 7,5 ccm Chinidinhydrochloridlösung versetzt. Nach 20 Minuten wurde nephelometriert. Endlich wurde in einem Teil der Ansätze der p_H elektrometrisch bestimmt. Neben den Spaltansätzen wurden auch solche angesetzt, die 30 Minuten gekochte Fermentlösung enthielten.

Ansatz Nr.	p_H	Essigsäure (im Ansatz)	Natronlauge (zur Neutralisation)	Aussehen (Ansatz)	Spaltung %
I	1,8	2,2 ccm Eisessig	4,5 ccm n	klar	0
II	3,04	3 ccm n	2,8 „ n/10	trübe	30,7
III	3,91	0,4 „ n	0,6 „ n/10	stark geflockt	0
IV	5,35	2 Tropfen n	0,05 „ n/10	trübe	31,6
V	6,88	1 Tropfen n/50	ohne Zusatz	klar	11,2
VI	wie II. Ansatz, mit Fermentabkochung				

Ergebnis: Man erkennt in der Kurve zwei ausgeprägte Maxima (p_H 3 und 5,3) und eine tiefe Einsenkung bei p_H 3,9. Die stärkste Flockung lag bei p_H 3,9.

Versuch 20 (Protokoll 125).

Optimum-p_H-Kurve von Carcinomextrakt V (Mamma), verdünnt 1 : 20. Spaltzeit 17 Stunden.

Caseinansätze wie üblich. Die p_H-Messungen geschahen nach der Spaltung.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
1,9	0	3,27	23,7	4,89	11,9
2,87	17,0	3,55	13,8	5,39	18,7
3,02	17,5	3,93	4,3	7,48	0

Ergebnis: Man erkennt die beiden Optima in der Nähe von p_H 3 und 5 und die Einsenkung bei p_H 4. Ferner zeigt die Kurve, daß bei p_H 7,5 keine Spaltung zu beobachten ist.

Versuch 21 (Protokoll 31).

Optimum-p_H-Kurve von Carcinomextrakt I (Magen), verdünnt 1 : 50 nach 20 Stunden Spaltzeit.

Üblicher nephelometrischer Ansatz. Die p_H wurden nach der Spaltung gemessen. Stärkste Flockung bei p_H 4,1 und 4,6.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
1,9	0	4,1	27,8
3,0	14,5	4,6	31,7
3,3	9,6	5,8	15,7
3,8	10,9		

Ergebnis: Wie beim vorangehenden Versuch.

Versuch 22 (Protokoll 32).

Optimum-p_H-Kurve, wie Versuch 21, bei enger begrenztem p_H-Gebiet zwischen 2,6 und 4, Extraktverdünnung jetzt 1 : 20.

Versuchsbedingungen wie oben.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
2,64	17,8	3,55	11,1
3,02	23,0	3,8	17,3
3,20	14,5	4,0	21,8

Ergebnis: Der Versuch zeigt die beiden Optima und die Einsenkung bei p_H 3,5 bis 4.

Versuch 23 (Protokoll 36).

Carcinomextrakt IIIb (schwach alkalisch), verdünnt 1 : 50 bei verschiedenen Aziditäten gegen Casein. Spaltzeit 20 Stunden bei 37°.

Methodik: Die üblichen Caseinansätze. Messung der p_H nach dem Versuch.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,4	21	V	5,03	34,8
II	3,03	37,1	VI	6,56	10,0
III	3,60	25,9	VII	7,01	2,8
IV	4,24	29,3			

Ergebnis: Der alkalische Extrakt zeigt das gleiche Verhalten wie die schwach sauren Extrakte.

Versuch 24 (Protokoll 121).

Optimum-p_H-Kurve von Rindermilzextrakt *R* I, verdünnt 1 : 50. Spaltzeit 16 Stunden.

Ansätze wie üblich. Die p_H wurden nach der Spaltung gemessen.

p_H	Essigsäure im Ansatz	Spaltung %
1,88	3 ccm Eisessig	0
2,92	8 ccm n Essigsäure	44,7
3,07	3 „ n „	42,6
3,30	1,5 „ n „	28,7
3,59	0,8 „ n „	20,7
4,02	0,4 „ n „	7,4
4,19	2 „ n/50 „	20,3
5,30	0,3 „ n/50 „	79,6
6,22	1 Tropfen n „	61,1
6,61	2 „ n/50 „	48,6
7,51	ohne Zugabe	4,9

Kontrolle mit abgekochter Extraktverdünnung bei p_H 3 zeigt praktisch keine Spaltung. Stärkste Flockung bei 4,02 und 4,19.

Ergebnis: Das Schaubild dieses Versuchs zeigt die beiden Optima bei p_H 3 und 5,3 sehr scharf ausgebildet, ebenso die Einsenkung bei p_H 4.

Versuch 25 (Protokoll 187).

Optimum-p_H-Kurve vom Organextrakt *O* III (menschlicher Leber), verdünnt 1 : 50 bei 37° und einer Spaltzeit von 14 Stunden.

Die Methodik war die gleiche wie bei den vorherigen Versuchen. Die Messung der p_H geschah nach dem Versuch.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,24	14,6	V	5,19	27,2
II	2,94	28,6	VI	5,81	16,3
III	4,18	15,7	VII	6,90	0
IV	4,85	17,4			

Ergebnis: Auch das Schaubild dieses Versuchs zeigt die Einsenkung und die beiden charakteristischen Optima.

Versuch 26 (Protokoll 239).

Optimum-p_H-Versuch mit Milzextrakt *R* IIIa, verdünnt 1 : 20 gegen Casein und 21 Stunden Spaltzeit.

Die üblichen Caseinansätze wurden unter Anwendung von m/15 Phosphatpuffer hergestellt.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	5,29	54,6	IV	8,17	34,5
II	6,22	49,4	V	8,63	19,8
III	6,93	27,3			

Ergebnis: Man erkennt ein Optimum bei etwa p_H 8.

Versuch 27 (Protokoll 244a).

Carcinomextrakt IX, verdünnt 1 : 5 gegen Casein bei p_H 8,1 und einer Spaltzeit von 23 Stunden und 37°.

Der p_H des üblichen Ansatzes wurde mittels m/15 Phosphatpuffer eingestellt.

Ergebnis: Es konnte keine Spaltung beobachtet werden.

Versuch 28 (Protokoll 265).

Tumorextrakt X (Sarkom), verdünnt 1 : 3 gegen Casein bei p_H 6 bis 9 und 23 Stunden bei 37°.

Einstellung der p_H mittels m/15 Phosphatpuffer.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
5,88	19,9	7,98	16,4
7,07	4,7	9,24	0

Ergebnis: Man erkennt ein deutliches Optimum bei etwa p_H 8.

p_H-Optimumkurven mit Gelatine als Substrat.

Versuch 29 (Protokoll 145).

p_H-Optimumkurve von unaktiviertem Carcinomextrakt V (1 : 15) bei verschiedenen Aziditäten gegen Gelatine bei 22 Stunden und 37°.

Zu 12 ccm Gelatine (1 %ig) wurden die zur Einstellung der p_H notwendigen Mengen Essigsäure bzw. Natronlauge gegeben; dann wird mit Wasser auf 46 ccm aufgefüllt. Nach dem Durchmischen wurden 10 ccm (davon zweimal 4,5 ccm = Nullabnahmen) entnommen. Von der mit Wasser hergestellten Fermentverdünnung werden 4 ccm zu dem Ansatz gegeben. Nach der oben genannten Spaltzeit wurden je zweimal 5 ccm entnommen. Diese und die mit Extraktverdünnung auf 5 ccm ergänzten Nullabnahmen wurden mit 11 ccm Wasser und 4 ccm Sulfosalicylsäure auf 20 ccm gebracht und die hierbei entstehende Trübung nach genau 5 Minuten im Kolorimeter mit vertikaler Durchsicht gemessen. Alle gefundenen Werte wurden entsprechend der Eichkurve erhöht und schließlich auf ganze Zahlen abgerundet. Nach der Analyse wurden in einem Teil der Ansätze die p_H gemessen.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,02	0	IV	5,88	0
II	3,00	8	V	6,4	0
III	4,07	11			

Ergebnis: Man erkennt ein Optimum bei p_H 4, doch sind die Werte bei Berücksichtigung der bei der Gelatinemethode möglichen Fehler nicht völlig exakt.

Versuch 30 (Protokoll 166).

Optimum-p_H-Kurve von mit H_2S aktiviertem Carcinomextrakt VI (verdünnt 1 : 30). Spaltzeit 20 Stunden. Temperatur 37°.

Die Methodik der Ansätze, Abnahmen und Messungen war dieselbe wie beim vorherigen Versuch.

Die Extraktverdünnung enthält ein Fünftel ihres Volumens (d. h. vollaktiviert) Schwefelwasserstofflösung (2 mg H_2S in 1 ccm Wasser).

Ansätze ohne H_2S zeigten keine Spaltung.

Ansatz	p_H	Säure- bzw. Laugemengen	Spaltung %
I	2,08	2 ccm Eisessig	4
II	2,90	2,5 „ n Essigsäure	22
III	3,90	0,3 „ n „	70
IV	5,22	0,1 „ n/100 „ NaOH	67
V	5,96	2 „ n/100 NaOH	21
VI	7,4	0,2 „ n/10 NaOH	5

Ergebnis: Man erkennt ein sehr ausgeprägtes Optimum zwischen p_H 4 und 5. Die Messung der p_H geschah in Parallelansätzen ohne H_2S elektrometrisch.

Versuch 31 (Protokoll 153).

Optimum-p_H-Kurve von mit H_2S aktiviertem Tumorextrakt X (Sarkom) (verdünnt 1 : 100) gegen Gelatine. Spaltzeit 21 Stunden.

Methodik und H_2S-Mengen wie beim vorigen Versuch.

Zwei Ansätze bei p_H 4 ohne H_2S zeigten keine Spaltung.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	1,82	0	IV	5,30	68
II	3,08	24	V	6,27	18
III	3,97	82	VI	7,4	0

Ergebnis: Der Versuch zeigt eine optimale Spaltung bei p_H 4 und entspricht dem vorigen.

Versuch 32 (Protokoll 114).

p_H-Optimumkurve von unaktiviertem Rindermilzextrakt *R* I (1 : 25) bei verschiedenen Aziditäten ohne H_2S. Spaltzeit 20 Stunden, Temperatur 30 bis 32°.

Methodik wie vorherige Versuche.

Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,37	6
II	3,24	11
III	4,47	42
IV	5,13	37
V	5,7	30
VI	7,2	0
mit gekochter Extrakt-Verdünnung	4,5	0

Ergebnis: Die Kurve zeigt das Optimum in der Nähe von p_H 4 und bestätigt die Versuche von *Kleinmann* und *Stern*.

Versuch 33 (Protokoll 245).

Milzextrakt *R* III a verdünnt 1 : 20 gegen Gelatine bei verschiedenen p_H und einer Spaltzeit von 25 Stunden bei 37°.

Die p_H der üblichen Gelatineansätze wurden mittels m/15 Phosphat oder Phosphatpuffer eingestellt. Die Messung der Trübung geschah im Kolorimeter.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
4,73	28,2	8,28	29,3
6,44	13,4	9,04	9,5
7,40	21,7		

Ergebnis: Nach diesem Versuch scheint ein Optimum bei p_H 8 vorzuliegen, doch sind die Ergebnisse wegen der wiederholt besprochenen Anomalien bei Gelatine mit größter Vorsicht zu bewerten.

p_H-Optimumkurven mit verschiedenen Substraten.

(Serumalbumin, Extrakt-Eigeneiweiß, Edestin, Organeiweiß.)

Versuch 34 (Protokoll 140).

Milzextrakt *R* I (1 : 10) bei verschiedenen Aziditäten nach einer Spaltzeit von 48 Stunden bei 37°.

Zu 12 ccm einer Serumalbuminlösung in Wasser (1 : 3) wurden bestimmte Mengen Essigsäure bzw. Natronlauge zur Einstellung der p_H und so viel Wasser gegeben, daß ein Volumen von 46 ccm entsteht. Die Abnahmen und Fermentzugaben geschahen wie bei den anderen Substraten. Wie diese wurden auch hier die Ansätze mit einigen Tropfen Toluol zur Verhütung bakterieller Einwirkung versetzt. Die Abnahmen wurden mit 5 ccm Salzsäure (25 %ig) und 7.5 ccm Sulfosalicylsäure (20 %ig) versetzt und nach 5 Minuten im Nephelometer untersucht. Die Messung der p_H geschah nach dem Versuch.

Ansatz	p_H	Säure- bzw. Laugemengen	Spaltung %
I	1,8	2 ccm Eisessig	0
II	3,9	0,25 „ n Essigsäure	32,4
III	4,5	2 Tropfen n Essigsäure	33,1
IV	6,3	2 ccm n/50 NaOH	25,7
V	7,0	3 „ n/50 NaOH	16

Ergebnis: Entsprechend den Versuchen von *Kleinmann* und *Stern* wurde ein Optimum zwischen p_H 4 und 5 beobachtet.

Versuch 35 (Protokoll 141).

Carcinomextrakt VI gegen Serumalbumin bei verschiedenen Aziditäten über 66 Stunden bei 37°.

Ausführung wie beim vorherigen Versuch.

Ergebnis: Bei den p_H 1,8. 4,5. 3,96 und 6,3 war keinerlei Spaltung zu beobachten.

Versuch 36 (Protokoll 251).

Einwirkung von Milzextrakt *R* Va (schwach sauer), Verdünnung 1 : 5, auf sein Eigeneiweiß bei verschiedenem p_H, 37° und einer Spaltzeit von 22 Stunden.

Ansätze und Abnahmen geschahen wie in dem Kapitel II. 2 (Methodik) beschrieben wurde.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
4,18	56,7	7,10	6,6
4,68	50,5	7,96	14,2
6,03	6,1	9,2	0

Ergebnis: Starke Spaltwirkung im katheptischen, geringe im tryptischen Gebiet.

Versuch 37 (Protokoll 298b).

Tumorextrakt X, verdünnt 1 : 3, gegen sein Extrakt Eigeneiweiß bei verschiedenem p_H und einer Spaltzeit von 24 Stunden bei 37°.

Wie in dem Kapitel II. 2 ausführlich beschrieben, wurden die Ansätze in diesem Versuch hergerichtet.

Die Einstellung der p_H geschah mittels m/15 Phosphatpuffer, zum Teil auch unter Verwendung von n/10 Salzsäure. Die p_H wurden nachträglich gemessen.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
4,1	46,1	8,05	20,7
5,2	25,3	9,2	5,4
6,9	6,5		

Ergebnis: Man erkennt eine erhebliche katheptische Wirkung und eine geringe, aber deutliche Tryptasewirkung.

Versuch 38 (Protokoll 260).

Optimum-p_H-Kurve von Rindermilzextrakt *R* Va (1 : 25) gegen Edestin Spaltzeit 20 Stunden, Temperatur 37°.

Die Herstellung der Ansätze geschah entsprechend Kapitel II, 2. 20 ccm salzsaurer Edestinlösung wurden mit 6 ccm n/10 NaOH neutralisiert (bei Ansatz I aber nur 5,5 ccm) und mit dem p_H entsprechenden m/15 Phosphatpuffer eingestellt. Die Abnahmen von Ansatz III bis VI wurden

mit Salzsäure neutralisiert. Ansatz VII enthält in der Extraktverdünnung statt Wasser eine Aufschlemmung von Pankreas-Dispertpulver in Wasser 1 : 100000.

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	3,32	60,9	V	7,82	0
II	4,62	39,9	VI	9,20	0
III	6,40	0	VII		
IV	6,79	0	mit Pankreas	7,9	18,5

Ergebnis: Man erkennt eine starke Wirkung im katheptischen Gebiet. Im alkalischen Gebiet wird Edestin von Milzextrakt nicht angegriffen. Daß es aber nicht indifferent gegen Tryptase ist, zeigt Ansatz VII (mit Pankreas).

Versuch 39 (Protokoll 311).

p_H-Optimumreihe von Tumorextrakt X (verdünnt 1 : 10) gegen Edestin bei p_H 2,7 bis 9. Spaltzeit 22 Stunden, Temperatur 37°.

Die Ansätze I und II wurden nicht vollständig neutralisiert. Die Edestinlösung für die Ansätze III bis VI wurde mit 6 ccm n/10 Natronlauge neutralisiert. Pufferung soweit möglich geschah mit m/15 Phosphat

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,7	20,6	IV	7,2	0
II	4,08	35,8	V	8,1	0
III	6,0	14,9	VI	9,0	0

Ergebnis: Man erkennt keine Spaltung im tryptischen Gebiet. Tumorextrakt XII wurde nebenher bei p_H 4,1 gegen Edestin untersucht und lieferte bei diesem p_H eine Spaltung von 23,5 %.

Versuch 40 (Protokoll 216a).

p_H-Optimumkurve von Milzextrakt *R* II (verdünnt 1 : 15) gegen Lebereiweiß (verdünnt 1 : 4). Spaltzeit 24 Stunden. Temperatur 37°.

Über die Herstellung der Ansätze und Abnahmen sei auf das Kapitel II, 2 (Methodik bei Organeiweiß) verwiesen. Die Einstellung der p_H geschah mittels Essigsäure bzw. Natronlauge. Die Verdünnungen wurden mittels phys. Kochsalzlösung vorgenommen.

Die p_H wurden nachträglich gemessen.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
1,9	4	5,2	12
3,6	20	7,6	6

Ergebnis: Die stärkste Spaltung lag bei diesem Versuch bei p_H 3,6.

Aktivierungsverhalten.

Versuch 41 (Protokoll 64.)

Versuch einer Wirkungssteigerung von Rindermilzextrakt *R* I (verdünnt 1 : 40) durch H_2S gegen Casein bei p_H 3,0 und 24 Stunden Spaltzeit bei 37°.

Zu 7,5 ccm einer Extraktverdünnung 1 : 20 werden 3 ccm Schwefelwasserstoffwasser (1,7 mg/ccm) gegeben; mit Wasser wird auf 15 ccm ergänzt. Ferner wurde eine Verdünnung 1 : 40 ohne Zusatz benutzt.

Ansätze und Abnahmen wie üblich (vgl. Caseinmethodik, Kapitel II, 2).

Spaltung in Prozenten:

ohne	H_2S:	Ansatz I	37,4
„	H_2S:	„ II	38,8
mit	H_2S:	„ III	39,6
„	H_2S:	„ IV	36,9

Ergebnis: Kein Einfluß von Schwefelwasserstoff!

Versuch 42 (Protokoll 39).

Versuch einer Wirkungssteigerung von Milzextrakt *R* I (verdünnt 1 : 50) durch Cyanwasserstoff gegen Casein bei $p_H = 3$ und 21 Stunden Spaltzeit.

Zu den Ansätzen I und II wurde eine Mischung von einem Teil Extrakt und 49 Teilen Wasser gegeben. Die Ansätze III und IV erhalten dieselbe Verdünnung, aber mit 0,5 mg HCN pro Kubikzentimeter Verdünnung [d. h. 7,5 ccm Extraktverdünnung 1 : 25 + 1 ccm NaOH (1,2 %) + 1 Tropfen Methylrot + 0,3 n Essigsäure + Aqua dest. ad 15 ccm].

Spaltung in Prozenten:

ohne	HCN bei	Ansatz I . .	49,0
„	HCN „	„ II . .	49,1
mit	HCN „	„ III . .	42,6
„	HCN „	„ IV . .	42,9

Ergebnis: Der Versuch zeigt, daß Cyanwasserstoff keinen wirkungssteigernden Einfluß ausübt.

Versuch 43 (Protokoll 86).

Milzextrakt *R* I (verdünnt 1 : 50) mit und ohne Cyanwasserstoff gegen Casein bei p_H 3, 24 Stunden Spaltzeit bei 37°.

Ansatz und Abnahmemethodik wie bei den vorhergehenden Versuchen.

Die Vorbereitung der Aktivator-Fermentsysteme geschah wie oben angegeben.

Resultat: Spaltung in Prozenten (nephelometrisch gemessen):

ohne	HCN bei	Ansatz I	49,0
„	HCN „	„ II	49,1
mit	0,5 mg HCN	pro Kubikzentimeter bei Ansatz III .	42,6
„	1,5 „ HCN	„ „ „ „ IV .	42,9
„	1,5 „ HCN	„ „ „ „ V .	34,3
„	1,5 „ HCN	„ „ „ „ VI .	34,3

Ergebnis: Der Versuch zeigt, daß Cyanwasserstoff gegen Casein keine Aktivierung hervorruft, sondern eine deutliche der HCN-Menge proportionale Verminderung der Spaltung, deren Ursache vielleicht in einer

Verschiebung der Azidität oder Erhöhung des Salzgehalts bei der Neutralisation zu suchen ist. Das Resultat wurde durch mehrere andere Versuche bestätigt.

Versuch 44 (Protokoll 28).

Verhalten von Carcinomextrakt I (1 : 50) mit Schwefelwasserstoff gegen Casein bei p_H 3,1 und 20 Stunden Spaltzeit.

Die üblichen Ansätze erhalten 4 ccm einer Extraktverdünnung 1 : 50 bzw. eine solche, die folgendermaßen bereitet wurde. In eine Verdünnung 1 : 25 wurde während 15 Minuten Schwefelwasserstoff eingeleitet und danach Luft durchgeleitet. Eine dunkle Trübung wurde durch Zentrifugieren entfernt. Danach wird auf 1 : 50 verdünnt. Ferner wurde eine Verdünnung 1 : 50 hergestellt, die aber vor dem Einleiten 30 Minuten gekocht wurde.

Spaltung in Prozenten (Mittelwerte):

ohne H_2S	21,1
mit H_2S	18,8
„ H_2S, vorher gekocht	2,4

Ergebnis: Kein Einfluß von Schwefelwasserstoff!

Versuch 45 (Protokoll 40).

Verhalten von Carcinomextrakt I (1 : 15) mit Cyanwasserstoff gegen Casein bei p_H 3 und 22 Stunden Spaltzeit.

Zu den Ansätzen I bis III wurde eine Verdünnung 1 : 50 gegeben; zu Ansatz IV bis VI eine solche, die 11 ccm einer neutralisierten Kalium-Cyanidlösung (2 mg/ccm) enthält, das sind 44 mg HCN pro 1 ccm Originalextrakt (1.5 mg pro 1 ccm Extraktverdünnung). Einwirkungszeit 1 Stunde.

Spaltung in Prozenten:

ohne	HCN	bei Ansatz	I	10,3
„	HCN	„ „	II	13,8
„	HCN	„ „	III	11,4
mit	HCN	„ „	IV	9,7
„	HCN	„ „	V	10,0
„	HCN	„ „	VI	10,2

Ergebnis: Kein Unterschied in der Spaltung mit und ohne Cyanwasserstoff!

Versuch 46 (Protokoll 81).

Versuch einer Wirkungssteigerung von Milzextrakt *R* I durch Schwefelwasserstoff gegen Serumalbumin bei $p_H = 3$, 45 Stunden Spaltzeit und 37°.

Übliche nephelometrische Ansätze und Abnahmen.

Substratverdünnung 1 : 5. Die Extraktverdünnung 1 : 10 enthält 6,7 ccm H_2S-Lösung (1,8 mg/ccm) pro 10 ccm.

Spaltung in Prozenten:

ohne	Schwefelwasserstoff	bei Ansatz	I	21,9
„	„	„ „	II	22,2
mit	„	„ „	III	21,1
„	„	„ „	IV	20,1

Ergebnis: Bei weiteren Versuchen war gleichfalls kein Unterschied zu erkennen.

Versuch 47 (Protokoll 87).

Milzextrakt *R* 1 mit und ohne Cyanwasserstoff gegen Serumeiweiß bei p_H 3,5 und 45 Stunden und 37°.

Die Extraktverdünnung 1 : 8 enthält 1 mg Cyanwasserstoff pro 1 ccm. Substratverdünnung 1 : 5.

Spaltung in Prozenten:

ohne Cyanwasserstoff	bei Ansatz I	20,5
„ „	„ „ II	22,9
mit „	„ „ III	19,8
„ „	„ „ IV	19,8

Ergebnis: Man erkennt also keine Aktivierung!

Versuch 48 (Protokoll 143).

Einfluß von Cyanwasserstoff auf Carcinomextrakt VII (verdünnt 1 : 10) bei p_H 3,95 gegen Serumalbumin. Spaltzeit 44 Stunden.

Substratverdünnung 1 : 3. Die Extraktverdünnung enthält 1,3 ccm Natriumcyanidlösung (1,2%ig) und die entsprechende Menge Essigsäure zur Neutralisation in 10 ccm.

Ergebnis: Die Ansätze I bis IV zeigen mit und ohne Cyanwasserstoff *keine Spaltung.*

Versuch 49 (Protokoll 142).

Einfluß von Schwefelwasserstoff auf Carcinomextrakt VII bei p_H 3,9 gegen Serumalbumin. Spaltzeit 24 Stunden bei 37°.

Extraktverdünnung 1 : 10 enthält 2 ccm Schwefelwasserstofflösung (2 mg/ccm) in 10 ccm Substratverdünnung 1 : 2.

Ergebnis: Die Ansätze I bis IV zeigen mit und ohne Schwefelwasserstoff *keine Spaltung.*

Versuch 50 (Protokoll 60).

Rindermilzextrakt *R* 1, verdünnt 1 : 60, mit Schwefelwasserstoff, gegen Gelatine, bei p_H 5,6 und 22 Stunden Spaltzeit bei 37°.

15 ccm Extraktverdünnung enthalten 6 ccm Schwefelwasserstoffwasser mit 1,7 mg Schwefelwasserstoff pro 1 ccm.

Übliche nephelometrische Ansätze; Messung im Kolorimeter.

Ansatz I	ohne H_2S	36% Spaltung
„ II	„ H_2S	35% „
„ III	mit H_2S	91% „
„ IV	„ H_2S	91% „
„ V	„ abgekochtem Ferment	0% „

Unter Berücksichtigung der entsprechenden Eichkurve und abgerundet beträgt die Spaltung

ohne Schwefelwasserstoff	etwa 40%
mit „	„ 100%

Ergebnis: Starke Wirkungssteigerung durch Schwefelwasserstoff.

Versuch 51 (Protokoll 189).

Extrakte *O* V (menschliche Milz), verdünnt 1 : 100 mit Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 4 und 14 Stunden Spaltzeit.

Die Ansätze mit Schwefelwasserstoff enthalten für ein Fünftel der Extraktverdünnung gesättigtes Schwefelwasserstoffwasser.

Die Ansätze mit Cyanwasserstoff enthalten in 10 ccm Extraktverdünnung 1 : 50 4 ccm Natriumcyanidlösung (1,2 %ig), welche mit Essigsäure gegen Methylrot neutralisiert wurde, und so viel Wasser, daß ein Volumen von 20 ccm entsteht.

Mittelwerte: Ansatz I und II ohne Aktivierung . . . 0 %
„ III „ IV mit H_2S . . . . . 38 %
„ V „ VI „ HCN . . . . . 7 %

Ergebnis: Schwefelwasserstoff aktiviert stark, bedeutend stärker als Cyanwasserstoff.

Versuch 52 (Protokoll 177).

Organextrakt *O* VII (menschliches Gehirn) (1 : 15) mit Schwefelwasserstoff, gegen Gelatine bei p_H 4 und 16 Stunden Spaltzeit.

Die Extraktverdünnung enthält zu ein Fünftel ihres Volumens Schwefelwasserstoffwasser (mit 2 mg H_2S in 1 ccm).

Zwei Ansätze ohne H_2S zeigen keine Spaltung. Zwei Ansätze mit H_2S geben im Mittel 18 % Spaltung.

Ergebnis: Gelatinespaltung ist hier an die Aktivierung mit Schwefelwasserstoff geknüpft.

Versuch 53 (Protokoll 175).

Carcinomextrakt V verdünnt 1 : 60, mit Schwefelwasserstoff, gegen Gelatine bei p_H 4.

Ergebnis: Schwefelwasserstoffmenge wie beim vorigen Versuch. Ansätze ohne Schwefelwasserstoff zeigten keine Spaltung. Ansätze *mit Schwefelwasserstoff* zeigten im Mittel *23* % Spaltung.

Versuch 54 (Protokoll 171).

Carcinomextrakt VII (1 : 30) mit Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 3,9.

Schwefelwasserstoffmenge wie bei den vorigen Versuchen. Ansätze ohne Schwefelwasserstoff geben keine Spaltung über 5 %. Zwei Ansätze *mit Schwefelwasserstoff* gaben im Mittel *53* % Spaltung.

Versuch 55 (Protokoll 189).

Carcinomextrakt IX mit Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 4.

Extrakt ohne Aktivator = 1 : 15 verdünnt, Extrakt mit H_2S (wie voriger Versuch) = 1 : 90, Extrakt mit HCN mit 2,2 ccm NaOH (1,2 %) und neutralisiert = 1 : 45.

Ansatz I (ohne Aktivator) . . . . . 0 % Spaltung
„ II („ „) . . . . . 0 % „
„ III und IV mit HCN . . . . . 0 % „
„ V mit H_2S . . . . . 19 % „
„ VI „ H_2S . . . . . 20 % „

Ergebnis: Durch Cyanwasserstoff keine, aber durch Schwefelwasserstoff erhebliche Wirkungssteigerung.

Versuch 56 (Protokoll 66).

Versuch über das Verhalten von Schwefelwasserstoff, sowie von Schwefelwasserstoff mit abgekochtem Ferment (Milzextrakt *R* 1) (1 : 60) gegen Gelatine bei p_H 4. Einwirkungszeit 21 Stunden bei 37°.

Ansätze und Abnahmen wie üblich.

Ansatz I: Es wurden 4 ccm einer Lösung zugegeben, die 2 mg Schwefelwasserstoff pro 1 ccm Wasser enthält.

„ II: 4 ccm folgender Lösung: Extrakt 1 : 30 wurde gekocht (30 Minuten) und wieder mit Wasser auf das Anfangsvolumen gebracht; hiervon werden 5 ccm mit H_2S-Lösung (1,7 mg ccm) versetzt und mit Wasser auf 10 ccm gebracht.

Ergebnis: Gelatine wurde weder durch Schwefelwasserstoff allein, noch durch Schwefelwasserstoff mit Fermentabkochung angegriffen. (Kolorimetrische Spaltwerte = 0 %.)

Versuch 57 (Protokoll 316).

Rindermilzextrakt *R* Vb (schwach alkalisch) mit und ohne Cyanwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 4 und 22 Stunden bei 37°. Extraktverdünnung = 1 : 25.

Die Fermentlösung enthält 1 mg HCN pro 1 ccm Extraktverdünnung. Gelatineansätze waren die üblichen.

Spaltung in Prozenten (Mittelwerte):

Ansätze ohne HCN = 61,
„ mit HCN = 89.

Ergebnis: Man erkennt, daß auch der alkalische Extrakt durch Blausäure aktiviert wird.

Versuch 58 (Protokoll 138).

Rindermilzextrakt *R* II *nach 4 Stunden* bei 37°, gegen Gelatine, bei p_H 4 mit 1, 10 und 99 % frisch gesättigtem Schwefelwasserstoffwasser (2,2 mg/ccm) in der Extraktverdünnung.

Extraktverdünnung = 1 : 100.

Ansatz	I	1 ccm Extrakt + 99 ccm H_2S-Lösung (= 218 mg	52 %	Spaltung
„	II	H_2S in 100 ccm H_2O)	51 %	„
„	III	1 ccm Extrakt + 10 ccm H_2S-Lösung + 89 ccm	51 %	„
„	IV	H_2O (= 22 mg H_2S in 100 ccm)	55 %	„
„	V	1 ccm Extrakt + 1 ccm H_2S-Lösung + 98 ccm	33 %	„
„	VI	H_2O (= 2 mg in 100 ccm	29 %	„
„	VII	ohne H_2S (1 ccm Extrakt + 99 ccm H_2O)	8 %	„
„	VIII		9 %	„

Versuch 59 (Protokoll 38).

Wirkung von Milzextrakt *R* I, 1 : 50, mit variierter Cyanwasserstoffmenge auf Gelatine bei p_H = etwa 3,5 und 21 Stunden Spaltzeit.

Ansätze I und II: ohne HCN.

Ansätze III und IV: mit 0,5 mg HCN pro 1 ccm Extraktverdünnung, d. h. 7,5 ccm Extraktverdünnung 1 : 25 + 7,5 mg HCN (= 1 ccm NaCN-Lösung, 1,2 %ig) + Aqua dest. zu 15 ccm.

Ansätze V und VI: mit 1,5 mg HCN pro 1 ccm Extraktverdünnung, d. h. 7,5 ccm Extrakt 1 : 25 + 22,5 mg HCN (= 3 ccm obiger Lösung).

Methode: In Reagenzgläser wurden die oben angegebenen Kubikzentimeter NaCN-Lösung gegeben; dazu ein Tropfen Methylrot und mit n Essigsäure (0,3 bzw. 0,9 ccm) neutralisiert; dazu die angegebenen Kubikzentimeter Extraktverdünnung 1 : 25; das ganze wird mit Wasser auf 15 ccm gebracht.

Auf diese Weise wurde bei neutraler bzw. fast neutraler Reaktion gearbeitet, wobei zu berücksichtigen ist, daß der Salzgehalt gegenüber den Ansätzen ohne Cyanwasserstoff ein wenig höher ist.

Spaltung in Prozenten (kolorimetrisch gemessen):

ohne HCN	bei Ansatz	I 12,5
„ HCN	„ „	II 9,4
mit 0,5 mg HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung	„ „	III 41,9
mit 0,5 ccm HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung	„ „	IV 38,7
mit 1,5 ccm HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung	„ „	V 75,3
mit 1,5 mg HCN pro Kubikzentimeter Extraktverdünnung	„ „	VI 72,0

Diese Zahlen sind entsprechend der Eichkurve um etwa 10 % ihrer Werte zu erhöhen.

Ergebnis: Der Versuch zeigt, daß mit steigender Cyanwasserstoffmenge die Aktivierung gegen Gelatine zunimmt.

Das Maximum der HCN-Menge ist aus technischen Gründen nicht feststellbar!

Versuch 60 (Protokoll 180).

Carcinomextrakt II, IVb, VI, VII, VIII und IX, verdünnt 1 : 15, unter Zusatz von Blausäure gegen Gelatine bei p_H 4 und einer Spaltzeit von 20 Stunden.

Ansätze wie üblich.

Blausäuremenge: 1 ccm Extrakt + 7,5 ccm NaCN (1,2 %) neutralisiert mit n Essigsäure, und mit Wasser auf 15 ccm gebracht (entspricht etwa 3 mg HCN pro 1 ccm Extraktverdünnung).

Ergebnis: Vier Extrakte zeigten keinerlei Spaltung, zwei Extrakte Spaltungen, jedoch unterhalb 10 %.

Versuch 61 (Protokoll 74a und 76).

Verhalten von Milzextrakt *R* I mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei verschiedenen Aziditäten. Extraktverdünnung 1 : 50, Spaltzeit 22 Stunden.

Ansätze und Abnahmen wie üblich. Messung geschah im Kolorimeter. Alle Spaltwerte sind entsprechend einer Eichkurve erhöht und abgerundet.

Ansatz	p_H	Säure bzw. Lauge (für p_H)	Spaltung in %	
			ohne H_2S	mit H_2S
I	2,1	2 ccm Eisessig	3	3
II	3,1	1,5 „ n Essigsäure	9	40
III	3,4	0,6 „ n „	16	67
IV	3,9	0,2 „ n „	23	92
V	5,2	0,2 „ n/100 NaOH		93

Versuch 62 (Protokoll 72).

Versuch über den Einfluß einer Inkubationszeit auf die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf Rindermilzextrakt *R* II, verdünnt 1 : 50, gegen Gelatine bei p_H 3 und 22 Stunden Spaltzeit.

Teilweise wurde das Ferment gleich nach der Zugabe von Schwefelwasserstoff, teilweise erst 1 Stunde nach Zugabe von Schwefelwasserstoff zu den Ansätzen gegeben.

Spaltung in Prozenten (Kolorimeter):

ohne Inkubationszeit bei Ansatz I 28,8
„ „ „ „ II 30,4
mit „ „ „ III 28,1
„ „ „ „ IV 28,3

Ergebnis: Die Werte zeigen, daß es gleichgültig ist, ob man das Extrakt-H_2S-Gemisch sofort oder erst nach einiger Zeit zu den Ansätzen gibt.

Versuch 63 (Protokoll 228).

Versuch über den Einfluß einer Inkubationszeit bei Aktivierung von Milzextrakt *R* IIIa, verdünnt 1 : 50, mit Blausäure gegen Gelatine bei p_H 4 und 20 Stunden Spaltzeit.

Ansätze wie üblich. Cyanwasserstoffmenge = 2,5 mg pro 1 ccm Extraktverdünnung.

ohne Inkubationszeit bei Ansatz I = 26,7 % Spaltung
„ „ „ „ II = 26,9 % „
bei Inkubationszeit von 30 Minuten bei Ansatz III = 25,2 % „
„ „ „ 30 „ „ „ IV = 25,9 % „

Ergebnis: Man erkennt, daß es gleichgültig ist, ob man die Extraktverdünnung sofort oder erst nach einer gewissen Einwirkungszeit den Ansätzen zusetzt.

Versuch 64 (Protokolle 61, 91 und 95).

Milzextrakt *R* I bei verschiedenen Verdünnungen mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 5,2 und 18 Stunden Spaltzeit.

Die Ansätze wurden nach der üblichen Methodik hergestellt. Kontrollansätze mit abgekochter Extraktverdünnung zeigten keine Spaltung. Die Schwefelwasserstoffmenge betrug 20 % H_2S-Wasser (gesättigt) in der Extraktverdünnung. Die Messungen geschahen kolorimetrisch. Alle Werte sind entsprechend einer Eichkurve erhöht und auf halbe Zehner abgerundet.

Extrakt-verdünnung	Spaltung in % ohne H_2S	Mittelwerte mit H_2S	Extrakt-verdünnung	Spaltung in % ohne H_2S	Mittelwerte mit H_2S
1 : 30	75	100	1 : 300	0	85
1 : 60	40	100	1 : 600	0	50
1 : 120	10	95	1 : 1000	0	0 (?)
1 : 180	5	90			

Versuch 65 (Protokollauszüge 138, 164 und 165).

Milzextrakt *R* II bei verschiedenen Verdünnungen mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 4 bis 4,1 und 20 Stunden Spaltzeit, bei 37°.

Übliche Ansätze und Abnahmen. 20 % der Fermentverdünnungen sind H_2S-Wasser mit etwa 2 mg in 1 ccm.

Extrakt-verdünnung	Spaltung in % ohne H_2S	Mittelwerte mit H_2S
1 : 15	39	
1 : 20	28	
1 : 30	22	100
1 : 100	9	
1 : 200	0	
1 : 360	0	90
1 : 600		44
1 : 1200		23

Versuch 66 (Protokoll 225).

Milzextrakt *R* IIIa bei hohen Verdünnungen, aktiviert mit Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei p_H 4 und 20 Stunden Spaltzeit.

Übliche Gelatineansätze. Ein Viertel der Extraktverdünnung ist Schwefelwasserstoffwasser.

Ansatz	Extrakt-verdünnung	Spaltung %	Mittelwert
I	1 : 600	48	43
II		38	
III	1 : 1200	19	20
IV		21	
V	1 : 1800	9,5	11
VI		13	

Sämtliche Werte sind nach der Eichkurve bereits erhöht worden.

Unaktiviert: Extrakt *R* IIIa, verdünnt 1 : 25 = 25 % Spaltung.

Versuch 67 (Protokolle 223, 224, 230 und 231).

Milzextrakt *R* IIIa bei verschiedenen Verdünnungen gegen Gelatine in verschiedenen Konzentrationen bei p_H 4,1 und 20 bis 23 Stunden Spaltzeit bei 37°. Aktiviert mit Schwefelwasserstoff.

Übliche Gelatineansätze. Die Abnahmen wurden nachträglich entsprechend wieder so verdünnt, als ob sie aus Ansätzen mit sonst üblicher Gelatinemenge stammen. Ein Viertel der Extraktverdünnung war gesättigtes Schwefelwasserstoffwasser.

Konzentration der angewandten Gelatinelösung %	Extraktverdünnung 1 : 50	1 : 60	1 : 80	1 : 100	
3	100	100	95	93	
5	100	100	87	78	p_H = 4 bis 4,1
10	67	65	55	34	
20	22	15	ger. als 10		p_H = 3,7

Sämtliche Werte sind Mittel aus Parallelen, die gut übereinstimmen und sind bereits nach der Eichkurve erhöht worden.

Versuch 68 (Protokolle 312 und 313).

Rindermilzextrakt *R* Va (1 : 50) mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen Edestin bei p_H 4,1 und 24 Stunden Spaltzeit bei 37°.

Übliche Edestinansätze. Ein Viertel der Extraktverdünnung ist Schwefelwasserstoffwasser.

Ansatz I ohne H_2S = 52,0 % Spaltung
„ II „ H_2S = 54,4 % „
„ III mit H_2S = 53,4 % „
„ IV „ H_2S = 54,5 % „

Ergebnis: Man erkennt keine Wirkungssteigerung.

Versuch einer Wirkungssteigerung bei p_H 8. Extraktverdünnung 1 : 25. Versuchsbedingungen und H_2S-Mengen wie oben.

Ergebnis: Keiner der Ansätze mit und ohne Schwefelwasserstoff zeigte eine Spaltung.

Versuch 69 (Protokoll 314).

Rindermilzextrakt *R* Va, verdünnt 1 : 5, mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen das Eiweiß des Extrakts bei p_H 4,3 und 22 Stunden Spaltzeit. Temperatur 37°.

Die Herstellung der Ansätze geschah, wie in dem Kapitel II, 2, Methodik, beschrieben.

Spaltung in Prozent (Mittelwerte aus je zwei Parallelen):

ohne H_2S 65
mit H_2S 51

Ergebnis: Man erkennt keine Wirkungssteigerung.

Versuch 70 (Protokoll 298a).

Rindermilzextrakt *R* V a (1 : 25) gegen Gelatine *bei* p_H *8* und 20 Stunden Spaltzeit.

Aktivierung mit Schwefelwasserstoff. Es wurde in Parallelen gearbeitet.

Ergebnis: Die Ansätze mit und ohne Schwefelwasserstoff zeigten Aufspaltungen der Gelatine zu 15 bis 20 %, eine Wirkungssteigerung der Tryptase fand nicht statt.

III. Qualitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen.

4. Verhalten bei adsorptiver Abtrennung und Reinigung.

Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, daß auch im Verhalten bei Adsorption und Elution sich Kathepsin aus Tumoren vollkommen analog verhält wie Organkathepsin. Die verschiedenen verglichenen Fermentlösungen zeigten stets übereinstimmend, daß sich aus leicht sauren Extrakten Kathepsin durch Adsorption an Kaolin entfernen läßt, worauf das Ferment aus dem Adsorbat durch schwach alkalische Eluentien zum Teil wieder eluiert werden kann. Auch die aus den verschiedenen Extrakten gewonnenen Eluate zeigten das gleiche übereinstimmende Verhalten, sei es hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit, sei es der Form ihrer p_H-Optimumkurven.

Mit Rücksicht auf den Umfang vorliegender Untersuchung können für die Untersuchung nur immer einzelne Beispiele als Beleg angeführt werden.

a) Allgemeines Verhalten der verglichenen Organextrakte und Tumorextrakte bei Adsorption und Elution.

Extrakte aus Tumoren lassen sich ebenso trennen und reinigen wie Extrakte aus Organen. Es besteht prinzipiell kein Unterschied. Einer fraktionierten Adsorption und Elution sind lediglich insofern bei den Tumorextrakten Grenzen gesetzt, daß bei ihrem geringen Fermentgehalt die Spaltungsausschläge der Eluate gering und damit die möglichen Meßfehler groß werden können.

Der Versuch 70 zeigt das Verhalten eines Tumorextrakts (X) nach zweimaliger Adsorption und einmaliger Elution. Eine gut meßbare Menge des katheptischen Enzyms gelangte in das Eluat, während die gleichzeitig angestellte Prüfung auf Ereptase (siehe Versuch 72) zeigen konnte, daß das Eluat in bezug auf dieses Ferment nur noch Werte liefert, die innerhalb des Titrationsfehlers der Methode von *Linderström-Lang* liegen. In der Restlösung konnte dagegen eine ereptische Wirkung auf die beiden zur Verwendung gelangten Substrate Glycyl-Glycin und Leucyl-Glycin nachgewiesen werden. Durch wiederholtes Adsorbieren läßt sich der Kathepsingehalt der Restlösung allmählich verringern.

Die Verhältnisse bei adsorptiver Abtrennung entsprechen in qualitativer Hinsicht vollständig denen, wie sie *Kleinmann* und *Stern* bei den Extrakten aus Rindermilz beobachten konnten und nach deren Methode auch hier gearbeitet wurde (vgl. auch Kap. II, 3).

Daß es sich hierbei tatsächlich um Reinigungen handelt, geht zunächst aus der Abtrennung der Ereptase hervor. Des weiteren konnten *Kleinmann* und *Stern* (7) zeigen, daß bei Adsorption und Elution der Reinheitsgrad gegenüber ungereinigtem Milzextrakt um etwa das $2^1/_2$fache (und gegenüber der nicht sicher bekannten Konzentration in der Organtrockensubstanz um etwa das 20fache) gesteigert werden kann.

b) Optimum-p_H-Kurven der gereinigten Fermentlösungen.

Kleinmann und *Stern* (7) hatten gezeigt, daß Eluate aus Kathepsinadsorbaten, die aus Milzextraktlösungen gewonnen waren, die gleiche p_H-Optimumkurve aufwiesen wie die Rohextrakte. Hierbei hatte es

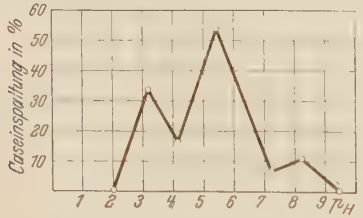


Abb. 1.
Optimum-p_H-Kurve von gereinigtem Milzextrakt gegen Casein als Substrat.

den Anschein, als ob die ganze Kurve bei den Eluaten etwas nach der sauren Seite hin verschoben war, doch war diese Änderung nur unbeträchtlich und die Kurvenform als solche durchaus erhalten.

Die Ergebnisse von *Kleinmann* und *Stern* konnten, was nicht besonders protokollmäßig belegt werden soll, durchaus bestätigt werden. Es sei lediglich die Kurve (Abb. 1) des Versuchs 71 wiedergegeben, die das Verhalten eines Eluats von Rindermilz-Fermentadsorbaten

gegen Casein zeigt. Außer den bekannten Kathepsinoptima erkennt man auch ein kleines Optimum im tryptischen Gebiet.

Des weiteren wurden nun p_H-Optimumkurven mit Eluaten aus Kaolinadsorbaten gegen Casein angestellt, die aus Carcinomextrakten (Versuch 73 und Sarkomextrakt X, Versuch 74) gewonnen waren. Die Abb. 2 und 3 veranschaulichen die Versuche.

Sie zeigen, daß auch gereinigte Tumorfermentlösungen die Form der p_H-Optimumkurven, wie sie die Rohextrakte geben, durchaus

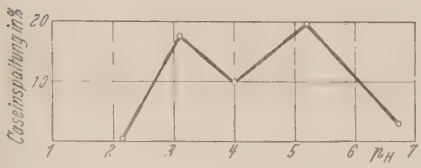


Abb. 2.
Optimum-p_H-Kurve von gereinigtem Carcinomextrakt VII gegen Casein als Substrat.

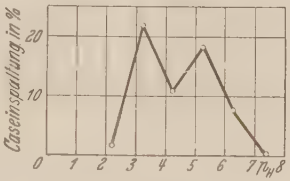


Abb. 3*.
Optimum-p_H-Kurve von gereinigtem Sarkomextrakt gegen Casein als Substrat.

bewahren. Beide Kurven zeigen die für Caseinumsätze charakteristischen Optima bei p_H etwa 3,1 und 5,1 bzw. 5,4 und die Einsenkung dazwischen.

Ob die ganze Kurve ein wenig nach der sauren Seite hin verschoben ist, kann aus diesen Versuchen nicht geschlossen werden, da hierzu zahlreiche Versuchspunkte notwendig wären. Dagegen zeigen die Versuche, daß das Verhalten gereinigten Tumorkathepsins das gleiche ist wie das des Organkathepsins. Daß die Eluate aus Tumorfermentadsorbaten kein Trypsin zeigen wie bei der Rindermilz, entspricht den quantitativen Verhältnissen. Die Eluate aus Rindermilz zeigen für Kathepsin optimal 52% Eiweißspaltung, für Trypsin etwa 10%. Bei $^2/_3$ bis $^1/_2$ so starken Tumorextrakten fällt die Trypsinmenge unter die Nachweisbarkeit.

Ein entsprechendes Bild geben gereinigte Organextraktlösungen mit Gelatine als Substrat. Auch hier ändert die Reinigung nicht oder nur um ein Geringes die Lage der p_H-Optimumkurve. Tumoreluate spalten ebenso wie die Rohextrakte Gelatine nicht.

c) *Aktivierungsverhalten der gereinigten Fermentlösungen.*

Für Milzextrakte hatten *Kleinmann* und *Stern* gezeigt, daß die gereinigten Eluate die gleiche Aktivierbarkeit gegen Schwefelwasserstoff aufweisen wie die Rohextrakte. Dagegen zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Eluate zu den Rohextrakten im Verhalten gegen

* Der Meßpunkt bei 5,3 p_H beträgt nicht 18 sondern 36%.

Cyanwasserstoff. Während die Rohextrakte durch Cyanwasserstoff gegen Gelatine aktivierbar waren, ließen sich die Eluate niemals durch Cyanwasserstoff aktivieren. Diese Befunde werden durch die Versuche 75 und 76 bestätigt.

Versuch 75 zeigt (s. Abb. 4), daß sowohl die Restlösung, die nach zweimaliger Adsorption noch proteinasehaltig war, als auch die Eluate stark durch Schwefelwasserstoff aktiviert werden konnten.

Als Substrat muß wie stets bei Aktivierungsversuchen Gelatine angewandt werden.

Versuch 76 prüft die Aktivierbarkeit von Restlösung und Eluat gegen Cyanwasserstoff. Während die Restlösung durch Cyanwasserstoff aktivierbar ist, wird das Eluat nicht aktiviert.

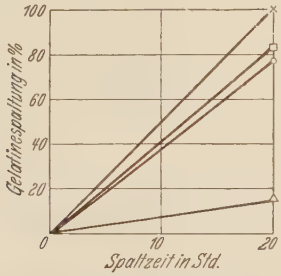


Abb. 4.
Aktivierung von Eluat und Restlösung eines Milzextraktes durch Schwefelwasserstoff gegen Gelatine als Substrat.
△ Eluat ohne H_2S
□ „ mit H_2S
◯ Restlösung ohne H_2S
× „ mit H_2S

Versuch 77 bestätigt diesen Versuch und somit die Ergebnisse von *Kleinmann* und *Stern*. Nunmehr wurden Aktivierungsversuche mit gereinigten Tumorextrakten angestellt.

Versuch 78 zeigt, daß Restlösungen und Eluat von Carcinomextrakten an sich zu wenig Proteinase enthielten, um aktiviert eine Gelatinespaltung zu erreichen.

Während in der Restlösung so wenig Ferment vorhanden war, daß auch mit Schwefelwasserstoff eine Spaltung nicht nachweisbar wurde, konnte mit dem Eluat durch Schwefelwasserstoff doch eine Spaltung von etwa 10% erreicht werden. Versuch 79 zeigt an einem Extrakt, der größere Fermentmengen enthielt, die Aktivierbarkeit der Eluate noch ausgeprägter.

Des weiteren zeigt er noch, daß Tumoreluate ebenso wie Organeluate gegen Casein durch Schwefelwasserstoff nicht aktivierbar sind.

IV. Quantitativer Vergleich der Tumorproteinasen mit Organproteinasen.

In den vorangehenden Abschnitten war versucht worden, den Nachweis zu führen, daß in Tumoren qualitativ völlig die gleichen Proteinasen vorhanden sind wie in normalen tierischen Geweben. Dieser Beweis beruhte darauf, daß hinsichtlich ihres kinetischen Verhaltens, hinsichtlich der Angreifbarkeit verschiedener Substrate, der Aziditäts-

optimumkurven und hinsichtlich ihres Aktivierungsverhaltens die Tumorproteinasen mit Proteinasen aus anderen normalen tierischen und menschlichen Organen identisch sind.

Es hatte sich ergeben, daß ebenso wie in tierischen und menschlichen Geweben verschiedenster Herkunft, so auch in malignen Tumoren vor allem Kathepsin vorhanden ist. Daneben scheint in weit geringerer Menge auch Trypsin vorhanden zu sein.

Im folgenden Abschnitt wird nun die Frage bearbeitet, in welchem Verhältnis, quantitativ betrachtet, Proteinasen aus malignen Tumoren zu Proteinasen normaler Gewebe stehen. Besteht doch seit den Untersuchungen, die eine gesteigerte Autolyse in Tumoren annehmen, die Ansicht, daß Tumoren einen erheblicheren Fermentgehalt aufweisen als andere Gewebe. Und führt doch diese Ansicht zwangsläufig zu der Vermutung, daß das Wachstum der Tumoren in Beziehung zu ihrem Fermentgehalt steht. Und wenn auch qualitativ die gleichen Fermente wirksam sind, so wäre es doch denkbar, daß grundlegende Unterschiede in der Menge der Fermente bestimmend für die Eigenschaften der Tumoren sein können.

Und schließlich, wenn auch die absolute Menge der vorhandenen Fermente in Tumoren nicht von derjenigen normaler Gewebe abweicht, so wäre doch vielleicht die Menge der in aktivem Zustande vorhandenen Proteinasen nicht gleichgültig.

Diese Meinung ist ja, wie in Abschnitt I gezeigt, gerade von *Waldschmidt-Leitz* für die Erklärung der Tumorenentwicklung herangezogen und mit den bei der Gärung entstehenden „aktivierenden Komplexen" verknüpft worden.

Daher ist in den folgenden Untersuchungen versucht worden, nicht allein die Fermentmenge schlechthin, sondern auch die in den Extrakten vorhandene Menge aktiven und noch aktivierbaren Ferments zu bestimmen.

Bei dem Versuch, derartige quantitative Vergleiche verschiedener Gewebe bzw. verschiedener Extrakte ungleicher Fermentkonzentration durchzuführen, ergaben sich wesentliche Schwierigkeiten.

Es ist kaum möglich, die Wirksamkeit eines Extrakts oder sonstigen Präparats in Werten eines absoluten Maßsystems auszudrücken, die unabhängig von der Methode sind.

Waldschmidt-Leitz hat die Wirksamkeit seiner Extrakte derart ermittelt, daß er dieselben bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration unter genau festgelegten Versuchsbedingungen auf eine bestimmte Menge Gelatine wirken ließ und die Menge durch die Fermentwirkung frei gelegter Aminogruppen zur Messung benutzte. Auf diese Weise

lassen sich zwar übereinstimmende Parallelwerte und untereinander vergleichbare Resultate erhalten. Aber alle Zahlen gelten allein für dieses System, für das nicht allein die Wasserstoffionenkonzentration, sondern Fermentkonzentration (in gewissen Grenzen), Reaktionsvolumen, Salz- und Glyceringehalt, Fermentsubstratverhältnisse u. a. m. bestimmend sind.

Bei Anwendung anderer Methoden ändern sich diese Verhältnisse durchaus. Und zwar treten nicht nur bekannte und gleichsinnige Änderungen wie z. B. größere Umsätze durch Verringerung der absoluten Substratmenge (Fortfall starker Glycerin- und Elektrolytkonzentrationen) auf, sondern es sind prinzipiell neue Erscheinungen zu beobachten.

So konnte – wie in Abschnitt III dargelegt wurde — gezeigt werden, daß das Aktivierungsverhalten von Fermentextrakten weitgehend von der Verdünnung abhängig ist. Da unter den Versuchsbedingungen von *Waldschmidt-Leitz* überhaupt nicht mit vollaktivierten Lösungen gearbeitet werden kann, so sind auch alle Ergebnisse über die vorhandenen Mengen aktivierten und unaktivierten Ferments nur mehr bedingt zu verwerten.

Auch hat es sich des weiteren gezeigt, daß überhaupt der Begriff aktiviertes und unaktiviertes Ferment von der angewandten Methode abhängig ist. Er gilt, wie unsere Versuche zeigten, überhaupt nur für die Anwendung von Gelatine als Substrat und fällt fort, wenn andere Substrate angewandt werden.

Um nun überhaupt die bisherigen Angaben der Literatur mit denen dieser Arbeit vergleichen und in Beziehung bringen zu können, wurde folgender Weg gewählt. Es wurde der Vergleich von Tumorextrakten und normalen Gewebsextrakten mittels der nephelometrischen Methodik gleichmäßig durchgeführt. Die Umsätze der nephelometrischen Spaltung wurden aber durch empirische Eichung in Beziehung zu den Einheiten *Waldschmidt-Leitz* gebracht, so daß mit den gegebenen Einschränkungen unsere Ergebnisse mit den Einheiten der Makromethoden ausgedrückt werden könnten.

Praktisch wurde folgendermaßen verfahren: Milzextrakte, von denen leicht genügende Mengen beschaffbar waren, wurden nach der Methode von *Waldschmidt-Leitz* ausgewertet.

Nach der Definition dieses Autors entspricht einer K(e) ein Zuwachs von 0,9 ccm 0,2 n NH_2 pro 0,18 g Gelatine unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei einer Spaltung von 24 Stunden und bei 30°.

Diese Einheiten wurden an den Milzextrakten ermittelt, sowohl in unaktiviertem, nativem, wie auch in mit Schwefelwasserstoff aktiviertem Zustande. Die Differenz beider Zahlen ergibt die unaktiv

vorhandenen, also aktivierbaren Fermentmengen. Aus technischen Gründen (um größere Ausschläge zu erhalten und den Vergleich verschiedener Methoden bei gleicher Spalttemperatur vornehmen zu können) wurde aber nicht bei 30, sondern 37° gearbeitet und zu der Umrechnung der Ergebnisse auf die Originaleinheiten ein Temperaturkoeffizient angewandt (vgl. *Kleinmann* und *Stern*). Da es sich um Bestimmungen der Größenordnung handelt, konnten kleine Fehler und Schwankungen dieses Koeffizienten bei den abgerundeten Werten vernachlässigt werden. Es genügt, die Zahl der bei 37° erhaltenen K(e) durch 2 zu dividieren, um praktisch den Wert der Originaleinheiten zu erhalten.

Bezieht man die gefundenen Kathepsineinheiten auf die Gewichtseinheit der Trockensubstanz des Extrakts, so erhält man den Kathepsinwert K(w). Mit diesen Messungen ist zunächst der Milzextrakt nach *Waldschmidt-Leitz* ausgewertet. Mit ihm können nunmehr Spaltungen nach der nephelometrischen Methode durchgeführt werden.

Da die Extrakte gegen Gelatine nach *Waldschmidt-Leitz* geeicht sind, so ist es sinngemäß, auch für die nephelometrische Methode zunächst Gelatine als Substrat zu benutzen. Es kann nun gezeigt werden, daß unter den Bedingungen der nephelometrischen Analyse bestimmte Gelatineumsätze durch Extraktmengen erfolgen, deren Kathepsingehalt nach der ursprünglichen Eichung in Einheiten *Waldschmidt-Leitz* ausdrückbar ist. Zur bequemeren Rechnung wurde die Einheit in 1000 kleine Einheiten mk(e) zerlegt. Die erhaltenen mk(e)-Werte kann man auf die Gewichtseinheit (g) des Trockenrückstands des Glycerinextrakts beziehen (s. S. 126).

Entsprechende Werte erhält man, wenn man die K(e) statt auf Trockensubstanz auf die Gewichtseinheit (g) des frischen Organs oder Gewebes bezieht, $K_1(w)$.

Ist die nephelometrische Spaltung nunmehr durch den nach *Waldschmidt-Leitz* ausgewerteten Milzextrakt gewissermaßen geeicht, so können nephelometrisch gemessene Spaltungen unbekannter Extrakte leicht auf die *Waldschmidt-Leitz*-Einheiten umgerechnet werden. Es ist selbstverständlich, daß der Vergleich der beiden Methoden nicht nur mit Gelatine als Substrat der nephelometrischen Analyse erfolgen kann. Der einmal geeichte (mit Gelatine nach *Waldschmidt-Leitz*) Milzextrakt kann auch nephelometrisch gegen Casein oder ein anderes Substrat ausgewertet werden. Es muß dann nur die Messung des unbekannten Extrakts gegen das gleiche Substrat erfolgen.

Die Benutzung anderer Substrate als Gelatine bietet nicht nur eine Bestätigung und Ergänzung der an Gelatine gewonnenen Ergebnisse, sondern hat auch andere Vorteile.

Die Caseinmethode ist nicht nur zuverlässiger als die Gelatinemethodik, sondern Tumorextrakte greifen unaktiviert Gelatine zu wenig an. Schon aus diesem Grunde mußten die Eichungen auch an Casein als Substrat durchgeführt werden.

Es werden also im folgenden Standardextrakte nach *Waldschmidt-Leitz* aus Rindermilz sowohl gegen Casein, als auch, aktiviert und unaktiviert, gegen Gelatine ausgewertet. Die gefundenen Werte werden mit solchen ihrer Konzentration nach unbekannten Extrakten verglichen und diese dadurch ausgewertet.

Es ist selbstverständlich, daß bei diesem Vorgehen Fehlermöglichkeiten gegeben sind.

Es muß jedoch betont werden, daß es bei der ganzen Untersuchung nicht darauf ankam, Abweichungen von einigen Prozenten darzustellen. Vielmehr lag uns daran, *Größenordnungen festzulegen.* Wenn tatsächlich Beziehungen zwischen Proteinasengehalt und Wachstum bei Tumoren bestehen, so müssen diese Beziehungen auffallend sein. Nur wesentliche Unterschiede im Fermentgehalt berechtigen, Schlußfolgerungen zu ziehen.

Und bei diesen Feststellungen spielen die hier möglichen Fehler nur eine untergeordnete Rolle.

Im folgenden sei nun das Vorgehen bei den Auswertungen näher dargestellt.

a) Auswertung von Rindermilzextrakten nach Waldschmidt-Leitz.

Zunächst sei als Beispiel die Eichung von Rindermilzextrakten nach *Waldschmidt-Leitz* gegeben. Es wäre vielleicht noch angenehmer gewesen, für die spätere nephelometrische Bestimmung von Carcinomextrakten die nephelometrische Methode an Carcinomextrakten, die nach *Waldschmidt-Leitz* untersucht worden waren, zu standardisieren. Aber die geringe Menge dieser Extrakte machte dies meist unmöglich. Auch konnte, da ja schlechthin ein Vergleich nach Kathepsineinheiten erfolgen sollte, kein Fehler darin gesehen werden, die Ausgangslösung für die Eichung beliebig zu wählen.

Das folgende Protokoll zeigt das Vorgehen bei der Auswertung.

Bestimmung der Kathepsineinheiten nach Waldschmidt-Leitz.
Methode: *van Slyke.*

(Protokoll 112a.)

Rindermilzextrakt *R* II, unaktiviert gegen Gelatine.

Ansatz: 10 ccm Extrakt + 0.9 ccm n Essigsäure + 5 ccm Gelatine (8 %ig) + 4,1 ccm Wasser = 20 ccm Reaktionsvolumen.

Genaue Beschreibung der Methode s. Kapitel II, 2.

Reaktionszeit 24 Stunden, Temperatur 37°, $p_H = 4{,}1$, Abnahmen = 1 ccm.

Leerwerte: Anfang 0,300 ccm N_2,
Ende 0,256 „ N_2.
Luftdruck: Anfang 741 mm,
Ende 743 „
Temperatur: Anfang und Ende 20°.

Spaltversuche: Zuwachs Kubikzentimeter Stickstoff bei
Ansatz I = 0,976 = 0,530 mg Amino-N
„ II = 1,011 = 0,549 „ „
„ III = 0,951 = 0,505 „ „
Zuwachs Aminostickstoff im Mittel = 0,528 mg,
„ 0,2 n NH_2 pro 9 ccm Ansatz = 1,69 ccm.

Diesen Werten entspricht ein Gehalt des nichtaktivierten Milzextrakts von *210 mk(e)*.

(Protokoll 112b.)

Bestimmung der Kathepsineinheiten nach *Waldschmidt-Leitz*. Rindermilzextrakt *R* II, aktiviert durch Einleiten von H_2S.

Ansatzmethodik wie beim vorigen Versuch.
Schwefelwasserstoff wurde 30 Minuten in die Ansätze eingeleitet.
Reaktionszeit 24 Stunden, Temperatur 37°, $p_H = 4{,}1$.

Leerwerte: Anfang 0,269 ccm N_2,
Ende 0,255 „ N_2 im Mittel.
Luftdruck: Anfang 744 mm,
Ende 741 „
Temperatur: Anfang und Ende 21°.

Spaltversuch:
Nullwert im Mittel = 1,395 ccm N_2
Endwert „ „ = 3,370 „ N_2
Zuwachs Aminostickstoff = 1,066 mg
„ 0,2 n NH_2 pro 9 ccm Ansatz = 3,41 ccm

Daraus: *Extrakt II + H_2S = 420 mk(e)*.

Die Auswertung dieses Milzextrakts wird gegeben, weil er vorzüglich bei den folgenden Auswertungsversuchen als geeichter Standardextrakt benutzt wurde. Er enthält nach dem Versuchsprotokoll unaktiviert 210 mk(e).

Bei dieser Angabe ist zu berücksichtigen, daß die erhaltenen Spaltwerte nicht allein aus der Gelatine als Substrat resultieren, sondern auch aus dem Eigeneiweiß des Fermentextrakts stammen.

Bei dem Extrakt *R* I, bei dem die Messung des Eigeneiweißabbaues durchgeführt wurde, zeigte es sich, daß der Abbau des Eigeneiweißes rund 34% der Gesamtaminostickstoffmenge betrug. Da aber bei den Arbeiten von *Waldschmidt-Leitz* der Eigeneiweißabbau bei der

Berechnung der Enzymeinheiten nicht berücksichtigt wurde, wurde auch hier die gesamte Aminostickstoffmenge der Berechnung zugrunde gelegt. Der Versuch zeigt die Auswertung des gleichen Milzextrakts nach *Waldschmidt-Leitz* nach erfolgter Aktivierung durch Schwefelwasserstoff. Der Extrakt zeigt nunmehr einen Gehalt von 420 mk(e). Die Wirkungssteigerung betrug also fast genau 100%.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der nach *Waldschmidt-Leitz* untersuchten Rindermilzextrakte. Sämtliche Werte sind mk(e)-Zahlen pro 1 ccm Originalextrakt, bestimmt nach *Waldschmidt-Leitz*.

Extrakt	mk(e)		Aktivierung
	ohne H_2S	mit H_2S	%
R I	160	330	106
R II	210	420	100
R III a	160	380	137

Man erkennt aus der Tabelle, daß die Werte der verschiedenen Extrakte untereinander der Größenordnung nach übereinstimmen. Die Werte der unaktivierten Extrakte entsprechen ferner auch denen, wie sie *Kleinmann* und *Stern*, sowie *Waldschmidt-Leitz* und *Deutsch* gefunden haben.

Die mk(e)-Zahlen allein geben jedoch noch nicht exakt vergleichbare Werte. Sie werden daher auf die Gewichtseinheit aschefreier Trockensubstanz des entsprechenden Extrakts bezogen und man erhält den zugehörigen Kathepsinwert K(w) = 1000 mk(e) pro 1 g Trockensubstanz, wie ihn die oben genannten Autoren bezeichneten.

Zum Vergleich noch besser geeignet sind die Werte, die man erhält, wenn man die mk(e) auf die Gewichtseinheit der Frischsubstanz bezieht (Organ, Gewebe). Sie werden als K_1(w)-Zahlen in den folgenden Tabellen angegeben.

Zur Bestimmung der Trockenrückstände wurde folgendermaßen vorgegangen: Einige Kubikzentimeter Extrakt (bzw. Eluat) werden in einem kleinen Tiegel auf dem Wasserbad zur Vertreibung des Wassers erhitzt und dann im elektrisch geheizten Vakuumtrockenapparat sehr vorsichtig bei einem Druck von 10 bis 15 mm auf etwa 100° bis zur Gewichtskonstanz erhitzt und hiernach im gleichen Tiegel geglüht und der Aschegehalt vom Trockenrückstand in Abzug gebracht.

Auf Trockenrückstandsbestimmungen dialysierter Extrakte und Eluate wurde verzichtet.

Im folgenden seien die K(w)- und $K_1(w)$-Werte und die ihnen entsprechenden Aktivierungen nach *Waldschmidt-Leitz* ausgewerteter Milzextrakte gegenübergestellt.

Extrakt	K(w)		$K_1(w)$		Wirkungssteigerung
	aktiviert	unaktiviert	aktiviert	unaktiviert	%
R I	15,2	6,9	0,52	0,25	108
R II	13,1	6,6	0,79	0,39	100
R IIIa	14,1	3,9	0,64	0,27	104

Man sieht also, daß die K(w)-Werte der verschiedenen Milzextrakte sehr gleichartig sind, d. h. die Wirksamkeit der extrahierten wirksamen Substanz ist recht konstant. Etwas mehr variiert $K_1(w)$, d. h. die aus den Milzen extrahierbare Fermentmenge.

Ganz entsprechend dem Vorigen, kann man nun die mk(e) und K(w) von Eluaten ermitteln und erhält vergleichbare Zahlen.

In der Tabelle auf S. 209 wird eine Reihe von Trockenrückstandswerten wiedergegeben.

b) Nephelometrische Auswertung von Fermentextrakten unbekannten Gehalts gegen geeichte Rindermilzextrakte.

Benutzt man nun den nach *Waldschmidt-Leitz* geeichten Rindermilzextrakt zur Eichung der von uns verwandten Methodik, so ist es möglich, auf verschiedenen Wegen vorzugehen. Es ist die Aufgabe, zu bestimmen, wieviel *Waldschmidt-Leitz*-Einheiten des standardisierten Milzextrakts unter gegebenen nephelometrischen Bedingungen notwendig sind, um einen bestimmten Umsatz zu erzielen.

Zunächst seien die Auswertungen gegen Gelatine als Substrat besprochen.

α) *Auswertungen gegen Gelatine als Substrat.*

Da die Extrakte nach *Waldschmidt-Leitz* gegen Gelatine als Substrat bestimmt wurden, sei zunächst auch die nephelometrische Analyse gegen Gelatine durchgeführt. Trotzdem ist zu sagen, daß die Gelatinemethode zwar zur Orientierung hinsichtlich der Größenordnung genügende, für genaue Messungen aber nicht hinreichende Werte ergibt. Die Messung der Gelatinetrübung ist, worauf schon mehrfach hingewiesen wurde, nicht absolut zuverlässig. Trotzdem ist die Anwendung von Gelatine als Substrat absolut notwendig, da nur an ihr zu entscheiden ist, wieviel Ferment in aktivem und wieviel in noch aktivierbarem Zustande vorliegt.

Zur Eichung der nephelometrischen Gelatinemethode ist nun zunächst darauf hinzuweisen, daß allein die nach *Waldschmidt-Leitz* standardisierten, *unaktivierten* Extrakte in Frage kommen. Nur deren Gehalt an mk(e) ist als zuverlässig zu betrachten. Die nach *Waldschmidt-Leitz* standardisierten, aktivierten Extrakte sind nicht voll aktiviert. Ihre Messung hatte nur den Zweck, die Aktivierbarkeit des Ferments unter den von *Waldschmidt-Leitz* gegebenen Bedingungen zu prüfen.

Zur Eichung der nephelometrischen Messung stehen nun zwei verschiedene Wege bei der Gelatinemethode zur Verfügung.

Zunächst wäre es möglich, diejenige Substratmenge zu ermitteln, die unter den Bedingungen des nephelometrischen Versuchs von einer mk(e) abgebaut wird.

Während für die *van Slyke*-Methode auf 1 ccm Originalextrakt 0,04 g Gelatine als Substrat kommen, sind bei der hohen Verdünnung der nephelometrischen Ansätze die Substratmengen, die auf 1 ccm Originalextrakt kommen (nach den Verdünnungen errechnet), weit größer. Je nachdem, ob aktivierte oder unaktivierte Extrakte zur Anwendung gelangen, kommen auf 1 ccm Originalmilzextrakt etwa 0,3 bis 30 g Gelatine als Substrat.

Arbeitet man, wie zur Eichung notwendig, mit unaktivierten Milzextrakten, so kommen für die nephelometrische Technik Fermentverdünnungen in den Grenzen 1 : 10 bis 1 : 50 in Frage.

Setzt man mit diesen Verdünnungen unter den Bedingungen des nephelometrischen Versuchs Spaltansätze an, so erhält man nach 20 bis 24 Stunden (die Differenz in dieser Zeitspanne ist unerheblich) Umsätze, deren Menge in Milligramm sich zu der angewandten Fermentmenge in mk(e) in Beziehung bringen läßt.

Anschließend seien als Beispiel die Zahlen einiger Versuche gegeben.

Rindermilzextrakt R I (unaktiviert). mk(e) pro 1 ccm unverdünnten Extrakt = 160. Sämtliche Ansätze wurden unter gleichen Bedingungen optimaler Azidität (p_H 4 bis 4,5) bei Spaltzeiten zwischen 20 und 24 Stunden und 37° untersucht.

Protokoll	Verdünnung	Entsprechend mk(e) im Ansatz	Spaltung %	mg-Gelatineabbau	Galatineabbau pro 1 mk(e)
48	1 : 10	65	46	43	0,7
144	1 : 20	52	35	24	1,1
190	1 : 30	13	17	16	1,2
74a u. 76	1 : 50	13	21	20	1,5

Rindermilzextrakt R II (unaktiviert). mk(e) pro 1 ccm Extrakt 210. Versuche unter gleichen Bedingungen wie Extrakt *R* I.

Protokoll	Verdünnung	Entsprechend mk(e) im Ansatz	Spaltung %	mg-Gelatine-abbau	Gelatineabbau pro 1 mk(e)
164	1 : 15	55	38	36	1
165	1 : 30	28	32	21	1,3
116	1 : 50	16	23	22	1,3
188	1 : 100	8	7	7	0,9
116	1 : 100	8	11	10	1,3

Man erkennt, daß sich die beiden Milzextrakte praktisch gleichen. (*Kleinmann* und *Stern* fanden bei einem Milzextrakt 1,3 mg Gelatineabbau pro 1 mk(e).

Man kann daher mit hinreichender Genauigkeit aussprechen, daß von (nichtaktivierten) Rindermilzextrakten, unter den Bedingungen der nephelometrischen Methode eine mk(e) dem Abbau von 1 mg Gelatine (± 0,3 mg) entspricht.

Zur Auswertung eines unbekannten Extrakts könnte man nun so vorgehen, daß man unter den Bedingungen der nephelometrischen Analyse den Abbau an Milligramm Gelatine mißt.

Unter Zugrundelegung von Proportionalität zwischen Substratumsatz und Fermentmenge läßt sich dann unter Berücksichtigung der Extraktverdünnung die Anzahl mk(e) in dem angewandten Extrakt berechnen.

Diese Arbeitsform wäre zweifellos die bequemste. Doch bietet sie Fehlermöglichkeiten.

So setzt sie vor allem eine Proportionalität zwischen Fermentmenge und Umsatz voraus, die nur im Anfangsteil der Spaltkurven und auch hier nicht immer zuverlässig erzielbar ist. Sie macht es also vor allem nötig, mit solchen Verdünnungen zu arbeiten, die praktisch nicht über 20 bis 30% Spaltung in der gegebenen Zeit hinausgehen.

Besser ist es, wie folgt vorzugehen: Es wird mit dem gleichen Milzextrakt unter den nephelometrischen Bedingungen mit einer Reihe verschiedener Verdünnungen eine Eichkurve angelegt. Hierzu werden möglichst zahlreiche Versuche angestellt und der Durchschnitt der verschiedenen Versuchspunkte genommen. (Abb. 5.)

Die Ordinate gibt die Gelatineumsätze in Prozent, die Abszisse die Kathepsinmengen in mk(e).

Der unbekannte Extrakt wird nun derart untersucht, daß eine geeignete Verdünnung eine mittlere Spaltung ergibt. Aus der Eich-

kurve läßt sich dann unmittelbar die mk(e)-Menge der untersuchten Verdünnung entnehmen. Mit dieser Methode sind nun die folgenden Werte ermittelt worden. Zunächst sei das Beispiel einer Eichkurve gegeben, die Durchschnittswerte verschiedener Versuche benutzt.

Abb. 5.
Eichkurve für die Bestimmung der Kathepsin-Einheiten (bei Gelatine als Substrat).

Mit dieser Eichkurve wurde nun eine Anzahl Milzextrakte, sowohl aktivierte als auch unaktivierte, untersucht.

Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Extrakt	mk(e) pro 1 ccm		K(w)		K_1(w)	
	unaktiviert	aktiviert	unaktiviert	aktiviert	unaktiviert	aktiviert
R I	150	6000	6,4	258	0,24	8,28
R II	180	7500	5,6	234	0,33	13,65
R IIIa	160	5500	5,9	204	0,27	9,17
R Va	etwa 200	—	—	—	—	—

Prozent Wirkungssteigerung in bezug auf:

Extrakt	mk(e)
R I	4000
R II	4200
R IIIa	3400

Wie die Tabelle zeigt, wird die Wirkung der Milzextrakte, die unter den Bedingungen der nephelometrischen Analyse reagieren, also weit stärker verdünnt (etwa in der Extraktverdünnung 1 : 500 bis 1 : 1000) aktiviert werden, durch Schwefelwasserstoff auf das 35- bis 40fache gesteigert. Bei dieser Verdünnung ist die Aktivierung wohl als maximal anzusehen und daher die beobachtete Wirkungssteigerung als die tatsächlich erreichbare zu betrachten.

Ebenso wie bei den Rindermilzextrakten sollen nun die mk(e) von Extrakten aus normalen menschlichen Organen und Geweben ermittelt werden. Wieder werden auf der Kurve die zu einer bestimmten

gefundenen Spaltung gehörenden mk(e) abgelesen und mit der entsprechenden Extraktverdünnungszahl multipliziert. Die Werte der folgenden Tabelle sind abgerundete Mittelwerte.

Extrakt	Herkunft	mk(e) pro 1 ccm unverdünnten Extrakt		K(w) pro 1 ccm unverdünnten Extrakt		K_1(w) pro 1 ccm unverdünnten Extrakt	
		unaktiviert	aktiviert	unaktiviert	aktiviert	unaktiviert	aktiviert
Menschl. Organe							
O III	Leber	105	4500	6,9	etwa 300	0,21	9,0
O V	Milz	105	2000	6,0	110	0,19	3,6
O VI	Niere	85	3100	6,8	250	0,19	5,6
O IV	Muskel	—	56	—	7,0	—	0,09
O VII	Hirn	—	47	—	8,0	—	0,07
O VIII	Haut	—	45	—	15,5	—	0,08
2. Serie							
O IX	Leber	117	4000				
O X	Milz	96	1400				
O XI	Niere	60	1200				
O XII	Hirn	—	71				
O XIII	Muskel	—	60				

Die vorstehende Tabelle zeigt zunächst, daß der Gehalt an vorhandenem wirksamen, d. h. noch nicht künstlich aktiviertem Ferment, normaler menschlicher Organe, mit etwa 60 bis 100 mk(e) im groben der Größenordnung der mk(e) unserer Rindermilz entspricht, jedoch um $^1/_2$ bis $^1/_3$ geringer ist als diese (etwa 150 bis 200). Der vorhandene entsprechende Kathepsingehalt menschlicher Muskulatur, Hirn und Haut ist geringer als der parenchymatöser Organe. Er ist so gering, daß mit den Extrakten unter den gegebenen Bedingungen eine meßbare Spaltung von Gelatine nicht erzielbar ist.

Aktiviert geben menschliche parenchymatöse Organe mk(e)-Werte zwischen 1200 und 4500. Diese betragen aber ebenfalls weniger als die aktivierter Rindermilzextrakte [5500 bis 7500 mk(e)]. Des weiteren zeigt die Tabelle, daß durch Schwefelwasserstoff gegen Gelatine der Kathepsingehalt der Organe ebenso verstärkbar ist, wie bei der Rindermilz. Und zwar betrug die Wirkungssteigerung das 30- bis 40fache.

Extrakte aus Muskulatur, Hirn und Haut, die unaktiviert nicht meßbar waren, ließen sich durch Aktivierung mittels Schwefelwasserstoff ebenfalls messen. In der verhältnismäßig hohen Konzentration (1 : 15) ergeben sie nach der Aktivierung zur Berechnung geeignete Spaltungen und mk(e)-Werte von etwa 50 bis 70.

Würde man annehmen, daß die Wirkungssteigerung bei ihnen ebenfalls auf das 30- bis 40fache gegangen wäre, so ergäben sich rund

1 bis 2 mk(e) (unaktiviert), d. h. die Spaltmengen geben Werte unterhalb des Meßfehlers. Betrachtet man nun die K(w)-Werte, so ist folgendes zu bemerken:

Dieselben sind auf den Trockengehalt des Glycerinextrakts selbst bezogen. Ist der Fermentgehalt eines Auszugs verhältnismäßig klein, desgleichen aber auch der Trockengehalt, so zeigt der K(w)-Wert keine Änderung, d. h. aber nur, daß die in den Glyceringehalt gegangene Substanzmenge von gleichartiger Wirkungsstärke ist. Ein Maß für den Fermentgehalt oder besser für den extrahierbaren Fermentgehalt des Organs gibt uns der Wert $K_1(w)$, der sich auf 1 g Frischorgan oder -gewebe bezieht. Man erhält dann für die parenchymatösen Organe Werte um 0,2 $K_1(w)$ und aktiviert 4 bis 9 $K_1(w)$. Nichtparenchymatöse Gewebe geben aktiviert nur 0,07 bis 0,1 $K_1(w)$.

Ebenso wie die Rindermilzextrakte und die Extrakte aus menschlichen Organen wurden nun die Werte einer Reihe von Tumoren ermittelt. Die folgende Tabelle gibt die zugehörigen Zahlen, welche abgerundete Mittelwerte darstellen.

Tumorextrakt	Herkunft	Aktivierte		
		mk(e)	K(w)	$K_1(w)$
I	Magen	—	—	—
II	Mamma	130	19,4	0,33
IIIa	Mamma (schwach sauer)	210	—	0,68
IIIb	Mamma (schwach alkalisch)	150	—	0,26
IVa	Mamma (stark sauer)	220	—	0,4
IVb	Mamma (stark alkalisch)	100	—	0,14
V	Mamma	250	24,5	0,47
VI	„	930	75,2	1,4
VII	„	650	etwa 50	1,3
VIII	„	1200	etwa 150	1,9
IX	Leber	300	40	0,41
X	Sarkom	1900	164	3,8

Sie gibt einen Überblick über Tumorextrakte, die durch Schwefelwasserstoff aktiviert wurden. Die mk(e) schwanken zwischen 100 und 1200. Nur einmal, bei einem besonders fermentreichen Sarkomextrakt (X), steigt der Wert auf 1900. Diese Werte sind keinesfalls höher, sondern deutlich geringer als die Werte der normalen parenchymatösen Organe (2000 bis 5000). Die K(w)-Werte, die ja nur etwas über die Wirksamkeit der in das saure Glycerin gegangenen Substanzmenge aussagen, kommen sich naturgemäß näher, bei Organen 100 bis 300, bei Tumoren zwischen 20 und 160 K(w). Die $K_1(w)$-Werte der Tumoren liegen zwischen 0,3 bis 4, und bei den normalen Organen lagen sie zwischen 4 und 9 (bzw. um 0,1 bei nichtparenchyma-

tösen Geweben). Die mk(e)-Zahlen bei Tumoren liegen also zwischen denen nichtparenchymatöser (Muskulatur, Haut und Hirn) und parenchymatöser Organe.

Schließlich muß noch einmal betont werden, daß alle Zahlen Annäherungszahlen sind und nur zur Orientierung hinsichtlich der Größenordnung dienen sollen. Deswegen sei weiter darauf hingewiesen, daß alle Angaben über Aktivierung und Aktivierbarkeit nur relativ sind, da sie unbedingt Gelatine als Substrat voraussetzen.

β) Auswertung gegen Casein als Substrat.

Wie im vorangehenden Abschnitt gezeigt wurde, erlaubt die nephelometrische Gelatinemethode nur Annäherungswerte. Des weiteren gestattet sie eigentlich nur den Vergleich aktivierter Extrakte. Unaktivierte Extrakte geringeren Fermentgehalts (Tumoren, Haut, Muskulatur, Hirn) greifen Gelatine nicht genügend an, um meßbare Ergebnisse zu erhalten. Die Ergebnisse an Gelatine zeigen also nur, daß — maximal aktiviert — in Tumoren weniger Kathepsin vorhanden ist als in parenchymatösen Organen. Wieviel in nichtaktiviertem Zustande vorhanden ist, läßt sich nicht sagen.

Nur so viel steht fest, daß, da die Umsätze gewöhnlich 30 bis 60% betragen und ein Umsatz von 10% feststellbar gewesen wäre, nicht mehr als $^1/_3$ bis $^1/_6$ in aktivem Zustande vorgelegen haben kann.

Daher erschien es wünschenswert, vergleichende Zahlenangaben an Casein durchzuführen. Hier sind die Vergleichswerte methodisch exakt und auch hinsichtlich Aktivierung usw. einheitlich.

Der in dieser Arbeit wiederholt angewandte Standardmilzextrakt *R* II zeigte vollaktiviert 420 mk(e) pro 1 ccm.

Der Caseinabbau muß selbstverständlich mit dem nach *Waldschmidt-Leitz* maximal aktivierten Extrakt in Beziehung gesetzt werden. Da hinsichtlich gegen Gelatine Aktivierung besteht, gegen Casein aber nicht, so ist die einzige Vergleichsmöglichkeit die, daß man von einem unbekannten Extrakt, der eine gewisse Caseinmenge umsetzt, sagen kann: er enthält soundsoviel mk(e), d. h. es würde unter den Bedingungen von *Waldschmidt-Leitz* aktiviert soundsoviel Gramm spalten oder Aminogruppen frei machen.

Auch hier soll zunächst gezeigt werden, wie viele Milligramm Casein von einer Kathepsineinheit abgebaut werden.

4 ccm einer Extraktverdünnung 1 : 50 enthalten z. B. 12 mk(e). Diesen stehen als Reaktionspartner 23,5 mg Casein zur Verfügung. Aus einer gemessenen prozentualen Spaltung kann man auf Milligramm

Caseinabbau umrechnen und die gewonnene Zahl durch die mk(e) der 4 ccm Extraktverdünnung dividieren. Man erhält so die Menge Caseinabbau, welche einer mk(e) entspricht.

Man könnte nun, wenn stets direkte Proportionalität herrschen würde, das gewonnene Resultat dazu benutzen, um rückwärts aus der Aufspaltung von Casein durch einen unbekannten Extrakt auf dessen mk(e) zu schließen. Jedem Milligramm abgebautem Casein entsprächen 2 mk(e).

Aus den bei Gelatine angegebenen Gründen ist es aber besser, den Gehalt nicht auf diese Weise zu errechnen, sondern es werden mit dem geeichten Standardextrakt *R* II besser nephelometrische Spaltansätze hergestellt und diese wie bei der vorhergehenden Gelatinemethode zum Anlegen von Eichkurven verwertet. Trägt man die den Verdünnungen entsprechenden mk(e) pro 1 ccm und die Umsätze graphisch auf, so erkennt man aus den Kurven, daß bei höheren Verdünnungen das Verhältnis Konzentration—Umsatz nahezu geradlinig wird (vgl. Kap. III, 1).

Unter Voraussetzung geeigneter Umsätze (etwa bis zu 40%) kann man aus der prozentualen Aufspaltung auf der Kurve die zugehörigen mk(e) ablesen, die mit der Verdünnungszahl multipliziert die Einheiten unbekannter Extrakte pro 1 ccm ergeben.

Über die Versuchsbedingungen ist noch zu sagen, daß die Ansatz-, Abnahme- und Meßmethode stets gleichartig sein muß, daß man Spaltzeiten von 20 bis 25 Stunden (vgl. Kap. III, 1) (Spaltmenge und Spaltzeit) und die Temperatur von 37° einhalten muß. Über die Wichtigkeit genauer Einhaltung des p_H wurde schon oben gesprochen. Es empfahl sich, beim ersten Optimum (p_H 3) zu arbeiten, obgleich die Aufspaltung beim zweiten Caseinoptimum (p_H 5,3) eine höhere ist, aber wegen erheblicher Flockung des Substrats der mögliche Fehler größer wird.

Im folgenden sei zunächst die Eichkurve für Casein gegeben (Abb. 6). Sie diente zur Berechnung aller folgenden Werte. Zunächst sei als Beispiel die Auswertung von Milzextrakten gegeben, da die ursprüngliche Eichung ja mit einem Milzextrakt erfolgt ist, ist es selbstverständlich, daß die Menge in anderen Milzextrakten mit den ursprünglichen nach *Waldschmidt-Leitz* ermittelten Werten übereinstimmen muß.

Im besonderen sei darauf hingewiesen, daß, da die mk(e) (bei den Caseinansätzen) gegen den aktivierten Rindermilzextrakt *R* II in Rechnung gesetzt wurden (der doppelt so stark ist wie unaktivierte), sich gegenüber der Gelatinemethode dadurch die doppelte Zahl der Einheiten ergibt.

Geringe Abweichungen sind selbstverständlich durch den Gebrauch mehrfacher Auswertungen und Vergleichsmengen nicht vermeidbar, zumal Fermentmethoden nie ganz genau reproduzierbare Meßzahlen liefern. Aber das Beispiel für die Extrakte *R* I bis *R* III, für die über den Umweg über die Caseinmethode die mk(e)-Werte 150 bis 170 [= 300 bis 350 : 2] [entsprechend etwa 13 K(w) bzw. 0,5 bis 0,75 K_1(w)] ermittelt wurden, zeigt im Vergleich zu den ursprünglichen direkt gemessenen die Richtigkeit unseres Vorgehens. Ebenso wurden nun die

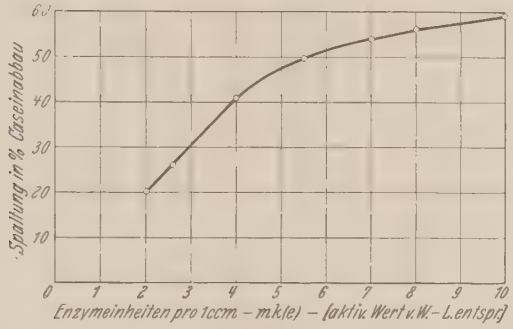


Abb. 6.
Eichkurve für die Ermittlung der Kathepsin-Einheiten (bei Casein als Substrat).

normalen Gewebe und Organe ausgewertet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse. Danach haben die parenchymatösen Organe 120 bis 180 Einh., während Haut, Hirn und Muskulatur 20 bis 40 mk(e) zeigten. Die K(w)- und K_1(w)-Werte für parenchymatöse Organe betragen 8 bis 10 K(w) bzw. 0,2 bis 0,3 K_1(w), für Muskulatur usw. 4,6 bzw. 0,03 bis 0,06.

Nunmehr folgt die Auswertung von Tumoren. Wie die gleiche Tabelle zeigt, liegen die Werte zwischen 80 und 140 mk(e) oder 6 bis 15 K(w) bzw. 0,06 bis 0,26 K_1(w), also in der Größenordnung von normalen parenchymatösen Organen. Eher erscheinen die Werte etwas kleiner. Dagegen enthalten sie etwas mehr Ferment als Muskulatur, Haut usw. Daß die Ergebnisse nicht vollkommen genau den Werten der Gelatineeichung entsprechen, ist selbstverständlich, konnte doch daselbst durch die mit Schwefelwasserstoff aktivierten Fermentmengen allein verglichen werden, während bei Casein der Begriff der Aktivierung fortfällt. Der Größenordnung nach entsprechen die Einheiten nach der Caseinmethode den unaktivierten Fermentmengen nach der Gelatinemethode, sofern man diese bei der letzteren ermitteln konnte.

Die Werte der sehr schwachen Extrakte in der Tabelle sind die maximalen und mehr als Schätzungen zu bewerten. Sämtliche Werte sind abgerundete Mittelwerte.

Extrakt	Herkunft	mk(e) ccm	K(w)	K_1(w)
Rindermilz				
R I		etwa 300	13,8	0,48
R II		350	13,2	0,64
R III		340	12,6	0,58
Menschl. normale Organe				
O III	Leber	140	9,4	0,28
O IV	Muskel	40	4—6	0,06
O V	Milz	140	7,8	0,25
O VI	Niere	120	9,6	0,21
O VII	Hirn	20	etwa 4[1]	0,03
O VIII	Haut	20	etwa 6[1]	0,03
2. Serie				
O IX	Leber	180		
O X	Milz	170		
O XI	Niere	170		
O XII	Hirn	35		
O XIII	Muskel	30		
Tumoren				
I	Magen	100	8,4	0,11
II	Mamma	80	12,0	0,16
III a	Mamma (schwach sauer)	40		0,08
III b	Mamma (schwach alkalisch)	140		0,26
IV a	Mamma (stark sauer)	100		0,18
IV b	Mamma (stark alkalisch)	80		0,11
V	Mamma	100	9,8	0,19
VI	„	100	8,2	0,16
VII	„	120	9,0	0,24
VIII	„	120	15,0	0,19
IX	Leber	40	etwa 6[1]	etw. 0,06[1]
X	Sarkom	120	10,4	0,21

[1] Maximalwerte, da Spaltwerte äußerst gering, sind die mk(e) aus der Kurve nicht exakt zu bestimmen.

Zum Vergleich der verschiedenen nach den beiden Eichmethoden (Gelatine und Casein) enthaltenen Werte sei folgende Tabelle gegeben, die zusammenfassend die Grenzen der ermittelten Extraktmengen bei den verschiedenen Gewebstypen gegenüberstellt.

Übersicht über die mk(e) pro 1 ccm der Glycerinextrakte

Extrakte	mk(e) unaktiviert		mk (e) aktiviert
	Gelatine	Casein	Gelatine
Rindermilzen	150—200	150—175	5500—7500
Parenchymatöse menschliche Organe . . .	60—117	60—90	1200—1500
Nichtparenchymatöse menschliche Organe	—	10—20	45—70
Menschliche Tumoren	—	20—70	1500—1900

Die Tabelle (bei der die Caseinwerte bereits durch 2 dividiert sind, s. oben) zeigt zunächst, daß die Caseinspaltungen durch diejenigen

Fermentmengen vor sich gehen, die bei der Gelatinespaltung als wirksam im nativen Gewebe vorhanden, d. h. nicht künstlich aktiviert in Erscheinung treten.

Die Größenordnung dieser Fermentmenge in Rindermilz und in menschlichen parenchymatösen Organen entspricht, nach beiden Methoden ermittelt, sich ausgezeichnet.

Aktiviert läßt sich gegen Gelatine die Wirkung bei Rindermilz etwa vervierzigfachen, bei den schwächeren menschlichen Extrakten etwa verdreißigfachen.

Bei den nichtparenchymatösen Organen und Tumoren, die ja unaktiviert Gelatine nicht angreifen, läßt sich die unaktivierte Fermentmenge nur aus den Caseinspaltungen ersehen. Der Fermentgehalt der Tumoren liegt zwischen dem der parenchymatösen Organe und dem der anderen Gewebe.

Der Fermentgehalt der Tumoren läßt sich gegen Gelatine nicht so stark aktivieren wie der der tierischen und menschlichen parenchymatösen Organe. Hieraus darf aber keineswegs der Schluß gezogen werden, daß Tumoren mehr „aktives Ferment" enthalten. Denn einmal zeigen menschliche nichtparenchymatöse Gewebe, wie Muskel, Hirn, Haut, vollkommen entsprechendes Verhalten wie Tumoren. Ob dies technisch mit dem geringeren Fermentgehalt und mit den bei der Aktivierung verhältnismäßig geringeren Verdünnungen zusammenhängt, ist nicht sicher zu sagen. Nach der Tabelle scheint, je mehr Ferment vorhanden ist, doch auch entsprechend stärker die Aktivierung zu sein, so daß eine vollkommen maximale Aktivierung auch bei unseren Verdünnungen nicht erreicht zu sein scheint.

Dann aber entspricht auch im nichtaktivierten Gehalt der Tumor durchaus den genannten Geweben.

Wenn auch alle Angaben Durchschnitts- und Annäherungszahlen sind, und wenn die Grenzen auch beträchtlich voneinander entfernt liegen, so sind die Größenordnungen doch so deutlich umrissen, daß ein sicheres Urteil möglich ist. Und dieses lautet, daß Tumorextrakte in ihrem Gehalt sich zwischen dem parenchymatöser Organe und dem anderer Gewebe einreihen, was praktisch durchaus dem morphologischen Zellgehalt entspricht.

Übersicht über die K_1(w)-Werte [mk(e) pro 1 g Frischsubstanz].

Extrakte	Unaktiviert K_1(w)		Aktiviert K_1(w)
	Gelatine	Casein	Gelatine
Rindermilzen	0,24—0,33	0,24—0,32	8,28—13,65
Parenchymatöse menschliche Organe . . .	0,19—0,21	0,11—0,14	3,6 — 9,0
Nichtparenchymatöse menschliche Organe	—	0,01—0,03	0,07— 0,09
Menschliche Tumoren	—	0,03—0,13	0,4 — 3,8

Betrachtet man diese K_1(w)-Werte, die den aus den Geweben extrahierbaren Fermentmengen noch besser entsprechen als die mk(e), so ergibt sich völlig das gleiche Bild.

V. Untersuchung über den Ereptasegehalt (Dipeptidase) von malignen Tumoren im Vergleich zu normalen Geweben.

Nachdem in den vorangehenden Abschnitten gezeigt worden war, daß qualitative und quantitative Unterschiede in dem Gehalt an Proteinase zwischen normalen Geweben und Tumoren nicht bestehen, war noch die Möglichkeit vorhanden, daß bösartige Geschwülste abweichende Ereptasewerte gegen die normalen Gewebe zeigen. Es wäre nicht ausgeschlossen, daß das Wachstum der Tumoren, wenn auch nicht mit Art und Menge der Proteinasen, so doch mit einem besonderen

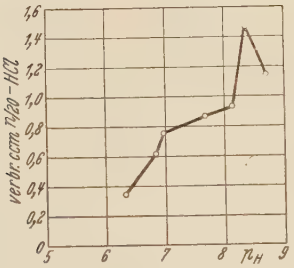


Abb. 7.
Aufspaltung von Leucyl-Glycin durch Tumorextrakt X bei verschiedenen p_H.

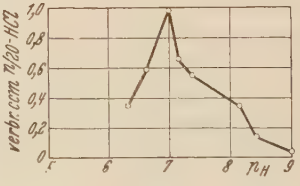


Abb. 8.
Aufspaltung von Glycyl-Glycin durch Tumorextrakt X bei verschiedenen p_H.

Ereptasenreichtum in Verbindung zu bringen wäre. Aus technischen Gründen war es in dieser Arbeit nur möglich, Dipeptidasen zu untersuchen. Es wurden einer Anzahl Extrakte aus Tumoren und normalen Organen die Dipeptide Leucyl-Glycin und Glycyl-Glycin vorgelegt und die freigelegten Aminogruppen nach *Linderström-Lang* titriert (vgl. Kap. II, 2b).

Die Untersuchungen sind nicht so ausführlich angestellt worden wie bei den Proteinasen und haben nur einen orientierenden Charakter; doch genügen sie wohl, um das Fehlen grundlegender Unterschiede im Ereptasegehalt erkennen zu lassen.

Zunächst seien die mit den beiden Substraten erhaltenen Aktivitäts-p_H-Kurven gegeben (Abb. 7 und 8). Vgl. Versuch 80.

Der Extrakt aus Tumor X enthält demnach deutlich Dipeptidasen, und zwar liegt ihr Wirkungsoptimum gegen Leucyl-Glycin bei p_H 8,3, bei Glycyl-Glycin bei p_H 6,9. Dieses Verhalten entspricht durchaus dem Verhalten normaler Ereptase. Es sei auf die Untersuchungen von *Husfeld* (9) verwiesen, der zeigte, daß in Myelocyten Ereptasen

(Dipeptidasen) vorhanden sind, deren Optimum gegen Leucyl-Glycin ebenfalls in der Nähe von p_H 8 und gegen Alanyl-Glycin sowie gegen Alanyl-Glycyl-Glycin bei etwa p_H 7 gelegen ist. Qualitativ entsprechen somit Extrakte aus Tumoren durchaus solchen aus normalen Zellen.

Weiterhin wurden einige Versuche angestellt, die zeigen sollen, daß in Extrakten, die einerseits durch alkalische, andererseits durch schwach saure Extraktion von Rindermilzen bereitet waren, die Ereptasemenge in beiden Extrakten nahezu gleich groß erscheint (s. Versuch 81). Die Extraktform (sauer oder alkalisch) ist somit für die Ergebnisse belanglos.

Nunmehr wurde eine Reihe quantitativer Bestimmungen ausgeführt. Es wurden zu den Untersuchungen Extrakte aus verschiedenen Tumoren sowie auch aus normalen Organen herangezogen. Die erhaltenen Resultate zeigt die folgende Tabelle.

Erepsinwerte einiger Extrakte nach einer Spaltzeit von 15 Stunden bei 37° (Titration nach Linderström-Lang).

Erklärung der Zahlen der folgenden Spaltenköpfe:

I = Extraktart und Nummer,
II = Trockensubstanz der Glycerinextrakte pro 1 ccm in Milligramm,
III = Verbrauchte Kubikzentimeter n/20 HCl pro 2 ccm Abnahme bei *Glycyl-Glycin*, p_H 7,1,
IV = dasselbe pro 1 g Trockensubstanz,
V = dasselbe pro 1 g Frischsubstanz,
VI = Verbrauchte Kubikzentimeter n/20 HCl pro 2 ccm Abnahme bei *Leucyl-Glycin*, p_H 8 bis 8,1,
VII = dasselbe pro 1 g Trockensubstanz,
VIII = dasselbe pro 1 g Frischsubstanz.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Rindermilz:							
R IIIa (schwach sauer)	27,0	0,7	130	6,0	1,05	188	9,0
R IIIc („ alkalisch)	25,2	0,79	160	—	0,77	155	—
Menschliche Organe:							
Leber *O* III	14,8	0,35	118	3,5	0,54	220	5,5
Milz *O* V	18,0	0,18?	50	1,63	0,72	195	6,5
Niere *O* VI	12,5	1,26	505	11,0	0,70	275	11,3
Muskel *O* IV	7,9	0,76	480	5,8	0,61	385	6,0
Milz *O* X (frisch)	etwa 17	0,87	200	—	1,12	300	—
Tumoren:							
VI	12,1	0,18	75	1,4	0,65	270	5,0
VII	13,9	0,14	50	1,4	0,65	235	6,5
VIII	8,0	0,23	145	1,7	0,64	400	5,4
IX	6,7	—	—	—	0,70	525	5,0
X	11,6	0,95	410	9,5	1,48	425	14,8

Die Werte der Spalte III der Tabelle geben für Glycyl-Glycin die beobachteten Titrationszahlen (Kubikzentimeter n/20 HCl),

in Spalte IV diejenigen Umsätze, die 1 g Trockensubstanz dieser Extrakte entsprechen würden (rechnerisch). Hier zeigt sich also die Wirksamkeit der in das Glycerin gegangenen, aus den Geweben extrahierten Substanz. Spalte V gibt die Werte von Spalte III, bezogen auf 1 g Frischsubstanz. Diese Zahlen geben am besten einen Vergleich über die aus den verschiedenen Materialien extrahierbaren Fermentmengen. Dasselbe gilt auch für die Spalten VI, VII und VIII für Leucyl-Glycin als Substrat.

Man erkennt, daß die Ausschläge der Leucyl-Glycinaufspaltung größer sind als die bei Glycyl-Glycin. Dieses Verhalten entspricht dem in der Literatur bekannten Verhalten der Gewebsereptase. Die Werte der verschiedenen Extrakte aus Tumoren schwanken etwas untereinander; vielleicht auch etwas nach dem Alter der verwandten Extrakte. Jedenfalls geht deutlich hervor, daß Tumor- und Organextrakte Erepsinwerte liefern, die in ein und derselben Größenordnung liegen, bei Leucyl-Glycin etwa zwischen 200 und 500 pro 1 g Extrakt Trockensubstanz bzw. 5 bis 15 pro 1 g Frischsubstanz.

Versuchsprotokolle.

Versuch 70 (Protokoll 240).

Reinigung von Tumorextrakt X und Einwirkung auf Casein bei 20 Stunden Spaltzeit und p_H etwa 3.

Reinigung wie üblich. Zweimal adsorbiert und einmal mit Phosphat eluiert.

Ansätze wie üblich. Zur Einstellung der p_H waren 3 ccm (bzw. für das Eluat 3,5 ccm) n Essigsäure notwendig.

Ergebnis: Die Restlösung hat Casein zu 40.7 % gespalten, p_H 3,0, das unverdünnte Eluat hat zu 20,4 % gespalten, p_H 3,15.

Versuch 71 (Protokoll 315).

Reinigung von Milzextrakt *R* III a und Optimum-p_H-Kurve des ersten + zweiten Eluats unverdünnt gegen Casein bei 22 Stunden Spaltzeit und 37°.

Zweimalige Adsorption mit Kaolinsuspension entsprechend der allgemeinen Vorschrift (Kapitel II. 3). Das Adsorbat wurde zweimal mit n/114 Ammoniak eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und zu den üblichen Caseinansätzen gegeben.

p_H	Spaltung %	p_H	Spaltung %
2,0	0	7,20	6,5
3,16	54	8,17	10,7
4,07	16	9,44	0
5,42	54,5		

Man erkennt die beiden Kathepsinoptima und ein schwaches Trypsinoptimum.

Versuch 72 (Protokoll 232).

Reinigung von Tumorextrakt X und Prüfung von Eluat und Restlösung auf Ereptase.

Zur Prüfung gelangen Eluat und Restlösung wie sie bei dem vorher beschriebenen Versuch (Protokoll 240) hergestellt wurden und auch dort gegen Casein ausgewertet sind. Es wurde also zweimal adsorbiert und einmal eluiert.

Ansätze und Abnahmen geschahen nach der Methode von *Linderström-Lang*. Es wurde mit n/20 HCl titriert. Als Substrate dienten Glycyl-Glycin und Leucyl-Glycin (Methodik s. Kapitel IIb).

Eluat (unverdünnt)

gegen Glycyl-Glycin bei p_H 7,2 Verbrauch . . 0,05 ccm HCl
gegen Leucyl-Glycin bei p_H 8,1 Verbrauch . . 0,05 „ HCl

Das Eluat erscheint also praktisch erepsinfrei.

Restlösung (unverdünnt)

gegen Glycyl-Glycin bei p_H 7,1 Verbrauch . . 0,16 ccm HCl
gegen Leucyl-Glycin bei p_H 8,0 Verbrauch . . 0,20 „ HCl

Versuch 73 (Protokoll 130).

Carcinomextrakt VII, gereinigt bei verschiedenen Aziditäten gegen Casein. Spaltzeit 20 Stunden bei 37°.

8 ccm Extrakt wurden nach der üblichen Vorschrift gereinigt, das Phosphateluat wurde in der Verdünnung 1 : 2 zu je 2 ccm zu den halben üblichen Caseinansätzen gegeben. Die Messung der p_H geschah nach dem Versuch.

Resultat:

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,10	0	IV	5,44	19,4
II	3,12	17,6	V	6,70	5,6
III	3,92	9,9			

Man erkennt die charakteristische Kurve.

Versuch 74 (Protokoll 207).

Optimum-p_H-Kurve des gereinigten Tumorextrakts X (Sarkom) gegen Casein in 22 Stunden Spaltzeit.

15 ccm wurden mit Kaolinsuspension gereinigt nach der Vorschrift wie sie in dem Kapitel „Reinigungsversuche" (vgl. auch Methodik) vorgeschrieben ist. Von dem Eluat wurden unverdünnt 2 ccm zu den halben Ansätzen gegeben. Die Messung der p_H geschah nach dem Versuch.

Resultat:

Ansatz	p_H	Spaltung %	Ansatz	p_H	Spaltung %
I	2,08	2,9	IV	5,10	36,1
II	3,12	22,2	V	6,22	14,6
III	4,07	10,7	VI	7,38	0,5

Auch bei dem gereinigten Extrakt erhält man die beiden charakteristischen Optima und die Einsenkung.

Versuch 75 (Protokoll 96).

Reinigung von Milzextrakt *R* I und Versuch einer Wirkungssteigerung durch Schwefelwasserstoff bei Eluat und Restlösung. Substrat: Gelatine bei $p_H = 4$. Spaltzeit 20 Stunden bei 37°.

Adsorptionsmittel: Kaolin.

Elutionsmittel: 1%ige Lösung von sekundärem Natriumphosphat (Na_2HPO_4).

Adsorption zweimal ausgeführt.

Adsorptions- und Elutionstechnik: 20 ccm Normalrohauszug mit 0,1 ccm Eisessig auf p_H = etwa 4 gebracht; dazu 20 ccm Kaolinsuspension (2,2 g Kaolin in 30 ccm Wasser). Das Gemisch wurde zentrifugiert und die Restlösung wie oben mit der gleichen Kaolinmenge in den gleichen Gläsern adsorbiert und zentrifugiert. Adsorbate wurden mit Leitfähigkeitswasser gewaschen und zentrifugiert. Die Adsorbate mit 20 ccm Eluationsmittel digeriert und nach einiger Zeit zentrifugiert. Das Eluat und die Restlösung wurden statt der Rohextrakte zu Spaltansätzen gegeben.

Ansätze:

Nr.	Fermentlösung	H_2S	Spaltung %	Mittelwert erhöht nach Eichkurve und abgerundet
I	Restlösung 1:2	(—)	68,6	77
II	„ 1:2	(—)	71,6	
III	„ 1:2	(+)	100	100
IV	„ 1:2	(+)	100	
V	Eluat 1:2	(—)	13,4	15—16
VI	„ 1:2	(—)	14,9	
VII	„ 1:2	(+)	78,0	82
VIII	„ 1:2	(+)	71,8	

Fermentverdünnung (Restlösung bzw. Eluat) 10 ccm + 4 ccm H_2S (bzw. H_2O) + Aqua dest. zu 20 ccm, p_H nachträglich = 3,32.

Der Versuch zeigt, daß sowohl Restlösung als auch Eluat durch Schwefelwasserstoff aktiviert werden.

Versuch 76 (Protokoll 98).

Reinigung und Wirkungssteigerung von Milzextrakt *R* I. Wie Versuch 75, aber Cyanwasserstoff statt Schwefelwasserstoff. Spaltzeit 20 Stunden

HCN-Menge 1 mg/ccm Fermentendverdünnung.

Nr.	Fermentlösung	HCN	Spaltung %	Mittelwert erhöht nach Eichkurve und abgerundet
I	Restlösung 1:2	(—)	52,8	55
II	„ 1:2	(—)	48,5	
III	„ 1:2	(+)	85,0	94
IV	„ 1:2	(+)	85,3	
V	Eluat 1:2	(—)	53,5	50
VI	„ 1:2	(—)	37,1	
VII	„ 1:2	(+)	27,9	45
VIII	„ 1:2	(+)	51,2	

p_H *nachträglich = 3,35.*

Der Versuch zeigt, daß Cyanwasserstoff das Eluat nicht, jedoch die Restlösung deutlich aktiviert.

Versuch 77 (Protokoll 99).

Reinigung und Wirkungssteigerung vom Milzextrakt *B* I. Wie Versuch 50. Spaltzeit 20 Stunden.

Es wurde nur das Eluat untersucht. HCN-Menge 1 mg/ccm Fermentendverdünnung, d. h. 7,5 ccm Eluat + 2 ccm NaCN-Lösung (1,2 %) + 0,6 ccm n Essigsäure + Aqua dest. zu 15 ccm.

Nr.	Fermentlösung	HCN	Spaltung %	Mittelwert erhöht nach Eichkurve und abgerundet
I	Eluat 1 : 2	(—)	13,7	13,5
II	„ 1 : 2	(—)	10,8	
III	„ 1 : 2	(+)	13,7	13—13,5
IV	„ 1 : 2	(+)	10,3	

p_H nachträglich = 3,30.

Eluat wird durch HCN nicht aktiviert.

Versuch 78 (Protokoll 152).

Carcinomextrakt IX (Eluat und Restlösung 1 : 2) mit und ohne Schwefelwasserstoff gegen Gelatine bei $p_H = 4$ und 21 Stunden.

Extraktreinigung: Zweimal adsorbiert (Kaolin, nach *Altmann* gereinigt), einmal eluiert (Phosphat).

Aktivatormenge — ein Fünftel der Fermentverdünnung, [H_2S-Lösung = 2 mg/ccm].

Prozent Spaltung:

Ansatz	I:	Restlösung	0
„	II:	„	0
„	III:	„ + H_2S	0
„	IV:	„ + H_2S	0
„	V:	Eluat	0
„	VI:	„	0
„	VII:	„ + H_2S	8 bis 9
„	VIII:	„ + H_2S	8 „ 9

Versuch 79 (Protokoll 196).

Reinigung von Tumorextrakt X (Sarkom) und Spaltung gegen Casein und Gelatine mit und ohne Schwefelwasserstoff bei 20 Stunden. Eluatverdünnung 1 : 2.

Adsorption und Elution wie Protokoll 96.

Caseinansätze enthalten 3 ccm n Essigsäure, Gelatineansätze 0,3 ccm n Essigsäure. H_2S-Menge — ein Fünftel der Eluatverdünnung, HCN-Menge = 1 mg pro 1 ccm.

Spaltung durch Eluate in Prozenten:

Casein	I	28,3
,,	II + H_2S	28,9
Gelatine	III ohne H_2S	0
,,	IV ,, H_2S	0
,,	V mit H_2S	100
,,	VI ,, H_2S	100
,,	VII ,, HCN	0
,,	VIII ,, HCN	0

Bei dem gereinigten Tumorextrakt X erkennt man gegen Gelatine weder mit noch ohne HCN eine Spaltung. Mit H_2S tritt eine erhebliche Wirkungssteigerung ein. Gegen Casein wird das Eluat durch H_2S nicht aktiviert.

Versuch 80 (Protokoll 285).

Optimum-p_H-Kurve von Tumorextrakt X gegen Glycyl-Glycin und Leucyl-Glycin nach *Linderström-Lang.*

Einstellung der p_H geschah mittels Phosphat- bzw. Boratpuffer. Die Messung des p_H geschah am Ende des Versuchs kolorimetrisch.

Für die Ansätze wurden 1,5 ccm der Peptidstammlösung mit 1,5 ccm Puffer, 1 ccm Glycerin-Wassergemisch und 1 ccm Extraktverdünnung 1 : 2 versetzt und mit Wasser auf 5 ccm gebracht.

Die Ansätze wurden vor der Fermentzugabe vorgewärmt. Reaktionstemperatur = 37°. Spaltungsabnahmen von je 2 ccm.

Sistierung mit Aceton und alkoholischer Salzsäure. Die gebildeten NH_2-Gruppen werden mittels n/20 alkoholischer Salzsäure gegen Naphthylrot als Indikator titriert. (Vgl. Abb. 34.)

Substrat			
Glycyl-Glycin		Leucyl-Glycin	
p_H	ccm n/20 HCl	p_H	ccm n/20 HCl
6,3	0,35	6,3	0,35
6,6	0,59	6,8	0,62
6,9	0,95	6,9	0,75
7,2	0,64	7,7	0,85
7,4	0,56	8,1	0,93
8,2	0,35	8,3	1,48
8,4	0,13	8,7	1,15
9	0,08		
Ausgeprägtes Optimum bei p_H 6,9		Optimum bei p_H 8,3	

Versuch 81 (Protokoll 280).

Vergleich von saurem und alkalischem Rindermilzextrakt in bezug auf Ereptase.

Die Technik der Ansätze und Messung war dieselbe wie sie im vorigen Versuch und auch noch genauer in Kapitel II, 2b beschrieben wurde. Die Extraktverdünnung betrug 1 : 2. Zur Anwendung gelangten je 1 ccm dieser Verdünnung.

Zum Vergleich sind auch die KOH-Zahlen angegeben, wie sie bei Titration mit Lauge resultieren.

Extrakt R III a gegen Glycyl-Glycin (p_H 7.2) (schwach sauer):
Verbrauch von n/20 HCl . . . . . = 0,7 ccm
gegen Leucyl-Glycin (bei p_H 8,1):
Verbrauch von n/20 HCl . . . . . = 1,05 „
Verbrauch n/20 KOH gegen Leucyl-Glycin . . . . . = 1,05 „

Extrakt R III c gegen Glycyl-Glycin (schwach alkalisch) (p_H 7.2):
Verbrauch von n/20 HCl . . . . . = 0,79 ccm
gegen Leucyl-Glycin (bei p_H 8,1):
Verbrauch von n/20 HCl . . . . . = 0,77 „
Verbrauch n/20 KOH gegen Leucyl-Glycin . . . . . = 0,75 „

Man erkennt keinen wesentlichen Unterschied im Ereptasegehalt saurer und alkalischer Extrakte.

Tabelle.

Trockenrückstandswerte einiger Glycerinextrakte.

Extrakt	Herkunft	mg aschefreie Trockensubstanz (Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen) pro 1 ccm Extrakt
Carcinom I	Magen	11,9
„ II	Mamma	6,7
„ V	„	10,2
„ VI	„	12,1
„ VII	„	13,3
„ VIII	„	8,0
„ IX	Leber	6,7
„ X	Sarkom	11,6
Menschliche Organe *O* III	Leber	14,8
„ „ *O* IV	Muskel	7,9
„ „ *O* V	Milz	18,0
„ „ *O* VI	Niere	12,5
„ „ *O* VII	Gehirn	6,0
„ „ *O* VIII	Haut	2,9
Rindermilz *R* I		23,3
„ *R* II		32,1
„ *R* IIIa		27,0
„ *R* IIIb	(schwach alkalisch)	25,2

VII. Besprechung und Zusammenfassung.

Es wird eine Übersicht über unsere Kenntnisse der eiweißabbauenden Fermente in normalen Geweben sowie in bösartigen Geschwülsten gegeben. Insbesondere wird auf die Theorie von *Waldschmidt-Leitz* eingegangen, hinsichtlich der maligne Tumoren eine

Sonderstellung einnehmen. Es soll durch den geänderten oxydativen Stoffwechsel der Tumoren eine Vermehrung der (S—H)-Gruppen auftreten, die wiederum eine Aktivierung der Proteolyse — im Gegensatz zu normalen Geweben — bedingt.

Es ergab sich die Aufgabe, die proteolytischen Fermente bösartiger Geschwülste (Carcinome und Sarkome vom Menschen) zu untersuchen und sie qualitativ wie quantitativ mit denen normaler Gewebe zu vergleichen.

Diese Untersuchungen wurden in Form und Ausdehnung durch Anwendung neuer Mikromethoden ermöglicht (Nephelometrie). Diese Methoden erlauben, auch mit so geringen Fermentmengen, wie sie aus dem Tumormaterial gewinnbar sind, ausführliche Untersuchungen anzustellen. Des weiteren erlauben sie — im Gegensatz zu der bisher meist angewandten Arbeitsweise — den Abbau des Eiweißes nicht an dem Auftreten von Spaltprodukten, sondern an der Aufspaltung des Substrats zu verfolgen. Dieses Vorgehen ist wesentlich für die Trennung von Tryptase- und Ereptasenwirkung.

Die nephelometrische Methodik zur Untersuchung von Gewebsfermenten wird eingehend beschrieben. Es werden Methoden zur fermentativen Spaltung von Gelatine, Casein, Edestin und Serumalbumin entwickelt. Da die Möglichkeit von besonderen Erscheinungen an arteigenem Eiweiß gegeben war, so wurden auch Methoden zur Untersuchung der Aufspaltung von Eiweiß, das aus verschiedenen menschlichen Geweben gewonnen wurde, sowie des Eigeneiweiß der Fermentextrakte selbst (Autolyse) dargestellt. Als Fermentextrakte wurden meist saure Glycerinextrakte der Gewebe verwandt. Es wurden vergleichsweise auch alkalische Glycerinextrakte sowie saure und alkalische wässerige Extrakte untersucht, doch zeigten die verschiedenen Extraktformen kein prinzipiell voneinander abweichendes Verhalten. Infolge der methodisch besten Eignung wurde daher mit sauren Glycerinextrakten gearbeitet.

Eine genaue Beschreibung der Extraktgewinnung wird gegeben.

Auf Grund der in vorangehenden Arbeiten gemachten Befunde wurden die Extrakte auf ihren Kathepsingehalt, Trypsingehalt und auf ihren Ereptasengehalt (Dipeptidasengehalt) untersucht.

Zunächst wurden Tumorextrakte mit Extrakten aus Rindermilz und Extrakten aus menschlichen Geweben (Milz, Leber, Niere, Gehirn, Muskulatur, Haut) qualitativ verglichen.

Die Tumorextrakte enthalten wie die anderen Gewebsextrakte vorzüglich Kathepsin. Fermentreiche Tumorextrakte zeigen mitunter auch geringe Trypsinwirkung. Doch entzieht sich die Trypsinwirkung entsprechend den oft schwachen Fermentkonzentrationen der Extrakte meist der methodischen Nachweisbarkeit.

Zum Nachweis des qualitativ gleichartigen Verhaltens des Kathepsins von Tumoren und normalen Geweben dienten folgende Untersuchungen.

Es wurde das kinetische Verhalten der Fermentwirkung der zu vergleichenden Extrakte gegen Gelatine und Casein geprüft. Die Beziehung zwischen Spaltzeit und Umsatz wird gemessen. Die Abhängigkeit von der Spaltzeit ist bei allen Extrakten und bei beiden angewandten Substraten gleichartig. Die in den Anfangszeiten starke Substrataufspaltung wird im Verhältnis zur Zeitzunahme immer geringer. Die Zeit-Umsatzkurve hat eine abflachende Form. Angenähert entspricht sie der *Schütz*schen Regel.

Untersucht man die Beziehung zwischen Umsatz und Fermentkonzentration an Gelatine und Casein, so findet man innerhalb bestimmter Grenzen bei Benutzung der Anfangskurventeile (etwa bis zu 30% Spaltung) annähernde Proportionalität zwischen Umsatz und Fermentkonzentration.

Daher gestattet unter den gegebenen Bedingungen wiederum die Konzentrationsumsatzkurve Schlüsse auf die Konzentration unbekannter Extrakte zu ziehen.

Zwischen Extrakten aus normalen Geweben und Tumorextrakten besteht somit in kinetischer Hinsicht kein Unterschied.

Des weiteren wurde die Form der Aziditätsumsatzkurven der zu vergleichenden Extrakte gegen verschiedene Substrate geprüft.

Alle zur Untersuchung gelangten Extrakte normaler Gewebe und maligner Tumoren zeigten gegen *Casein* scheinbar zwei Optima im sauren Gebiet. Die eine Kurvenerhebung liegt bei p_H etwa 3, die zweite bei p_H etwa 5. Das Optimum bei p_H 5 ist gewöhnlich etwas größer als das bei 3. Dies Verhalten ist — wie schon in vorangehenden Arbeiten gezeigt — mit Wahrscheinlichkeit auf die Flockung des Caseins bei seinem isoelektrischen Punkte, p_H etwa 4, zurückzuführen, bei dem unter den Bedingungen des Ansatzes eine Beeinträchtigung der Fermentwirkung erfolgt. Wahrscheinlich liegt das wahre Optimum gegen Casein bei p_H etwa 4; durch den Einbruch der Kurve an dieser Stelle werden aber zwei scheinbare Optima bei 3 und 5 vorgetäuscht.

Stark fermenthaltige Extrakte (auf Kathepsin bezogen), wie Extrakte aus Rindermilz oder menschlichen parenchymatösen Organen, zeigen noch ein drittes kleineres Optimum bei p_H 8.

Aus den in einer Arbeit von *P. Rona* und *H. Kleinmann*[1] dargelegten Gründen ist dies Optimum als für Tryptase beweisend anzusehen. Schwächer fermenthaltige Extrakte, wie solche aus den meisten Carcinomen, menschlicher Muskulatur, Haut, Hirn usw., lassen dies

[1] Siehe das folgende Heft dieser Zeitschr.

Optimum vermissen. Es ist anscheinend mit der gegebenen Methodik nicht mehr faßbar. Hier schließt sich an, daß einzelne besonders fermentreiche Tumorextrakte ein kleines drittes Optimum bei p_H 8, also Trypsin, aufweisen.

Gegen Gelatine liegt das Optimum bei etwa p_H 4. Dieses Optimum wird von den nativen Extrakten unmittelbar, d. h. ohne Aktivierung, nur von fermentreichen, wie Rindermilzextrakten oder Extrakten aus menschlichen parenchymatösen Organen gegeben. Die meisten Carcinomextrakte sowie die Extrakte aus menschlichen Geweben, die nicht parenchymatösen Organen entstammen, greifen Gelatine nicht oder nur sehr wenig an. Nach Aktivierung durch Schwefelwasserstoff ist mit diesen Extrakten ebenso wie bei allen anderen ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4 zu beobachten. Im alkalischen Gebiet läßt sich bei stärker fermenthaltigen Extrakten wie gegen Casein ein Optimum bei p_H etwa 8 und somit die Anwesenheit von Trypsin nachweisen. Dies wird als wesentlich angesehen, da die Gelatineversuche diejenigen an Casein bestätigen und zeigen, daß ein Optimum bei p_H etwa 8 beim Casein nicht durch einen Kurveneinbruch bei p_H etwa 7 so vorgetäuscht wird, wie dies im sauren Gebiet bei p_H 4 geschieht.

Trotzdem sind die Gelatineversuche im alkalischen Gebiet nur durch Wiederholung und orientierend verwertbar. Die Gelatinemethode ist im alkalischen Gebiet nicht völlig zuverlässig.

Gegen Serumalbumin liegt die optimale Spaltung bei p_H 4 bis 5. Nur fermentreiche Extrakte (s. oben) spalten Serumalbumin. Fermentarme, wie die meisten Tumorextrakte, greifen Albumin nicht mehr an.

Gegen Eiweiß aus verschiedenen menschlichen Organen ist ein breites Optimum bei p_H etwa 4 bis 5 vorhanden. Eine besondere Spezifität gegen arteigenes Eiweiß war weder bei Organ- noch Tumorextrakten zu beobachten. Organeiweiß wird ebenso wie Serumalbumin verhältnismäßig schwer angegriffen. Daher wird es von fermentreichen Extrakten (s. oben) deutlich, von den anderen und den Tumorextrakten nur schwach angegriffen. Tryptasewirkung war nicht nachweisbar.

Gegen das in den Extrakten enthaltene Eigeneiweiß (Autolyse) liegt ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4 vor. Das Eigeneiweiß der Extrakte wurde von allen Extrakten verhältnismäßig leicht angegriffen. Die fermentreicheren (s. oben) zeigen auch bei p_H 8 Tryptase, die anderen einschließlich der meisten Tumoren nicht.

Gegen Edestin war ein deutliches Optimum bei p_H etwa 4 bei allen Extrakten zu beobachten. Da Edestin verhältnismäßig schwer durch Trypsin angreifbar ist, wurde bei keinem der Extrakte eine Trypsinwirkung beobachtet. Die Aziditäts-p_H-Kurven zeigen also übereinstimmend bei allen Extrakten ein im sauren Milieu bei p_H etwa 4 bis 5

optimal wirkendes Ferment. Trypsin dagegen ist nur bei den verhältnismäßig leicht angreifbaren Substraten Casein, Gelatine und Eigeneiweiß der Extrakte zu beobachten und auch nur dann, wenn verhältnismäßig fermentreiche Extrakte vorliegen. Tumorextrakte verhielten sich im allgemeinen wie Extrakte, die nach ihrem Fermentgehalt zwischen denen menschlicher parenchymatöser Organe und anderer Gewebe stehen. Ein Unterschied gegen normale Gewebe war nicht nachweisbar.

Nunmehr wurde das Verhalten der Extrakte gegen Aktivatoren geprüft.

Die proteolytische Wirksamkeit des Kathepsins konnte sowohl durch Schwefelwasserstoff wie durch Cyanwasserstoff bedeutend verstärkt werden, wenn Gelatine als Substrat angewandt wurde.

Alle untersuchten Extrakte zeigten diese Wirkungssteigerung. Schwach wirkende Extrakte wie die aus Haut, Muskulatur und Tumoren, die an sich Gelatine überhaupt nicht anzugreifen vermögen, werden erst durch Behandlung mit den Aktivatoren fähig, dieses Substrat meßbar zu spalten. Diese Aktivierung zeigt sich bei allen Rohextrakten, d. h. allen ursprünglichen Glycerinextrakten, gleich, ob saure oder alkalische Extrakte untersucht wurden. Die Wirkungssteigerung ist von der Menge Schwefelwasserstoff und Cyanwasserstoff abhängig. Doch kann man für eine gegebene Fermentmenge ein Maximum an Aktivator erreichen. Bei Anwendung von Schwefelwasserstoff war es möglich, stets mit der maximalen Schwefelwasserstoffmenge zu aktivieren, bei Anwendung von Cyanwasserstoff war dies aus technischen Gründen nicht möglich.

Eine Variation der Inkubationszeit war ohne Einfluß auf die Aktivierung.

Dagegen ergab sich als sehr wesentlich die Verdünnung des Fermentextrakts, bei der die Aktivierung erfolgt.

Bei der Methodik von *Waldschmidt Leitz*, der mit verhältnismäßig sehr konzentrierten Extrakten arbeitet, gelingt es, im Rahmen der Methode die Wirkung des Kathepsins durch Schwefelwasserstoff etwa zu verdoppeln. Bei Anwendung der Nephelometrie, die mit viel verdünnteren Extrakten arbeitet, konnte die Wirkung des Kathepsins vervierzig- und verfünfzigfacht werden.

Diese Erscheinung ist nicht nur theoretisch wichtig, sondern wesentlich für alle quantitativen Bestimmungen. Ist es doch nicht möglich, Extrakte verschiedenen Fermentgehalts und daher bei der Messung auch verschiedenen Verdünnungszustandes nach Aktivierung und Spaltung von Gelatine einfach miteinander zu vergleichen. Ein solcher Vergleich könnte nur bei gleicher, maximaler Aktivierung erfolgen.

Es gelang zu zeigen, daß bei den angewandten Verdünnungen der Fermentextrakte von 1 : 25 bis 1 : 50 wenigstens annähernd eine vollkommene Aktivierung erfolgt war.

Während bei den nativen Extrakten eine Wirkungssteigerung sowohl durch Schwefelwasserstoff wie auch durch Cyanwasserstoff erzielbar war, ändert sich dieses Verhalten bei der Reinigung des Kathepsins.

In den Eluaten ließ sich das Kathepsin nur durch Schwefelwasserstoff, nicht aber durch Cyanwasserstoff aktivieren. Dies beruht nicht darauf, daß die Eluate leicht alkalische Reaktion haben (im Gegensatz zu den sauren Originalextrakten), da auch alkalische Originalextrakte durch Cyanwasserstoff aktivierbar sind. Das Verschwinden der HCN-Aktivierbarkeit muß unmittelbar mit dem Reinigungsvorgang zusammenhängen.

In allen diesen Erscheinungen verhalten sich Tumorextrakte wie Extrakte aus normalen Geweben.

Bei der Untersuchung der Aktivierungsvorgänge gegen andere Substrate, wie Casein, Edestin, Serumeiweiß, Organeiweiß, Eigeneiweiß der Fermentextrakte zeigte es sich, daß gegen diese überhaupt keine Aktivierung durch Schwefelwasserstoff oder Cyanwasserstoff zu beobachten war. Der Begriff der Aktivierung scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen von den angewandten Substraten allein auf Gelatine als Substrat beschränkt zu sein. Vermutlich hängt diese von Befunden anderer Autoren abweichende Erkenntnis mit der Messung der Fermentwirkung am Substrat zusammen.

Hierdurch werden die Schlußfolgerungen, die hinsichtlich der Bedeutung von (S—H)-Gruppen für den Aktivitätszustand der Proteinasen in den Zellen gezogen sind, in Frage gestellt. Das gleiche gilt dann auch für die Verknüpfung des Zurücktretens des aeroben Stoffwechsels mit der Entstehung von (S—H)-Gruppen.

Auch hier unterschieden sich Gewebsextrakte nicht von Tumorextrakten.

Das gleiche gilt für das Verhalten der Fermente bei adsorptiver Trennung und Reinigung. Tumorextrakte lassen sich genau so reinigen wie Gewebsextrakte. Es ist möglich, praktisch ereptasefreie Eluate zu erhalten. Die gereinigten Fermente liefern qualitativ die gleichen Aktivitäts-p_H-Kurven wie die ungereinigten. Das gereinigte Ferment ist aber nur durch Schwefelwasserstoff aktivierbar (gegen Gelatine).

Nach Durchführung des qualitativen Vergleichs wurde versucht, auch den quantitativen Vergleich hinsichtlich des Fermentgehalts normaler Gewebe und Tumoren zu ziehen.

Um eine Vergleichsmöglichkeit auch mit früheren Arbeiten zu schaffen, wurde versucht, die Einheiten nach *Waldschmidt-Leitz*, die an die Methodik des Autors gebunden sind, zu benutzen und unsere

Methoden entsprechend zu eichen bzw. eine Umrechnungsform durchzuführen.

Da die geringe Materialmenge die direkte Eichung von Tumorextrakten nach der *van Slyke*-Methode verbot, wurde derart vorgegangen, daß zunächst einige Extrakte aus Rindermilz gegen Gelatine sowohl nativ wie auch durch Schwefelwasserstoff aktiviert (maximal soweit es die Methode erlaubte) nach *Waldschmidt-Leitz* untersucht und ihr Fermentgehalt mk(e) festgestellt wurde. Des weiteren wurde durch Bezug auf den Trockenrückstand des Glycerinextrakts der Fermentgehalt der in den Extrakt gegangenen Substanz K(w) sowie durch Zugrundelegung der extrahierten Materialmenge die aus dem Material extrahierbare Fermentmenge K_1(w) dargestellt.

Mit diesen geeichten Extrakten wurden nun nephelometrische Spaltungen zunächst mit Gelatine durchgeführt. Die Umsätze wurden gegen die angewandten Fermenteinheiten graphisch dargestellt. Diese Eichkurven ermöglichten dann die Messung des Fermentgehalts unbekannter Extrakte und ihre Rückrechnung auf *Waldschmidt-Leitz*-Einheiten.

Die Fermentmengen normaler Gewebe wurden auf diese Weise (unaktiviert und aktiviert gegen Gelatine) gemessen.

Es ergab sich, daß die mk(e) von Rindermilzextrakten unaktiviert zwischen 150 und 200, diejenigen von parenchymatösen menschlichen Organen zwischen 60 und 105 liegen. Die mk(e) nichtparenchymatöser Gewebe und Tumoren lassen sich auf diese Weise nicht ermitteln, da deren Extrakte unaktiviert Gelatine nicht meßbar angreifen.

Die aktivierten Extrakte von Rindermilz zeigen einen Gehalt von 3500 bis 7500 mk(e), diejenigen aus parenchymatösen Organen von 1200 bis 4500 mk(e), von nichtparenchymatösen Geweben zwischen 45 und 70 und diejenigen von Tumoren einen Gehalt von 200 bis 1900 mk(e).

Da nun die Gelatinemethode nur orientierenden Wert lieferte, wurde des weiteren auch der Caseinumsatz zum quantitativen Vergleich herangezogen. Ebenso wie bei Gelatine werden nephelometrische Caseinumsätze kurvenmäßig mit den nach *Waldschmidt-Leitz* geeichten Extrakten dargestellt und der Umsatz in bezug auf Einheiten ausgewertet.

Die Umsätze der zu vergleichenden Extrakte gegen Casein wurden ermittelt und mittels der Eichkurven ausgewertet.

Bei diesem Vergleich ergab sich, daß die mk(e) menschlicher normaler Organe 120 bis 180 (60 bis 90[1]) betragen gegenüber etwa 300 bis 350 mk(e) (150 bis 175) der Rindermilzextrakte, wenn man sie

[1] Zum Vergleich mit den Gelatineeinheiten sind die Zahlen durch 2 zu dividieren; sie werden in ( ) gegeben.

auf die mk(e)-Werte bezieht, die die letzteren nach *Waldschmidt-Leitz* ausgewertet gegen Gelatine in aktiviertem Zustande hätten.

Nichtparenchymatöse Organe (Muskulatur, Haut und Hirn) geben nur mk(e) von maximal 20 bis 40 (10 bis 20), während Tumoren verschiedener Herkunft einen Kathepsingehalt von 40 bis 120 (20 bis 60) aufweisen.

Bezieht man die mk(e) auf die Gewichtseinheit des Frischgewebes, so zeigt es sich, daß die K_1(w)-Werte von Organen und Tumoren in der gleichen Größenordnung von 0,06 bis 2,8 liegen.

Aus allen diesen Versuchen folgt, daß weder qualitativ noch quantitativ Extrakte aus malignen Tumoren sich von solchen aus normalen Geweben unterscheiden. Die Tumorextrakte enthalten eher weniger Ferment als die Extrakte aus normalen parenchymatösen Organen. Sie stehen zwischen diesen und Extrakten aus nichtparenchymatösen Geweben. Der Fermentgehalt eines Gewebes geht also in großen Zügen dem Zellgehalt desselben parallel.

Schließlich wurden noch einige Versuche über den Erepsingehalt der Tumorextrakte im Vergleich zu solchen normaler Gewebe angestellt. Es wurde der Dipeptidasegehalt gegen Leucyl-Glycin und Glycyl-Glycin geprüft.

Das Aziditätsoptimum gegen Leucyl-Glycin wurde entsprechend den Angaben der Literatur bei p_H etwa 8, das gegen Glycyl-Glycin bei p_H etwa 7 gefunden. Auch konnte bestätigt werden, daß Leucyl-Glycin leichter als Glycyl-Glycin umgesetzt wird.

Qualitativ zeigte sich zwischen den verglichenen Extrakten hierbei kein Unterschied. Auch quantitativ ergab sich ein solcher nicht.

Sauer und alkalisch hergestellte Extrakte erweisen sich im Ereptasegehalt etwa gleich stark.

Alle Einzelbefunde führen zu dem Schluß, daß weder qualitativ noch quantitativ prinzipielle Unterschiede zwischen Extrakten normaler Gewebe und maligner Tumoren bestehen. Es besteht sonach bisher noch kein Grund, ihr Wachstum in Beziehung zu proteolytischen Vorgängen zu bringen.

Literatur.

1) *O. Warburg*. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer, 1928. — 2) *F. Blumenthal* u. *Wolff*, Med. Klin. 1905, S. 166. — 3) *C. Neuberg* u. *Gottschalk*, Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2. Aufl., **4**, 448. — 4) *E. Waldschmidt-Leitz* u. *A. Schäffner*, Naturw. **18**, 280, 1930. — 5) *S. G. Hedin*, Journ. of physiol. Chem. **167**, 285, 1927; Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 341, 531; Journ. of biol. Chem. **54**, 177, 1922. — 6) *E. Waldschmidt-Leitz* u. *W. Deutsch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **167**, 285, 1927. — 7) *H. Kleinmann* u. *K. G. Stern*, diese Zeitschr. **222**, 31, 84, 1930. — 8) *R. Willstätter* u. *E. Bamann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **180**, 127, 1929. — 9) *E. Husfeld*, ebendaselbst **194**, 137, 1931. — 10) *K. G. Stern*, ebendaselbst

199, 169, 1931. — 11) *S. G. Hedin*, ebendaselbst **188**, 261, 1930. — 12) *E. Waldschmidt-Leitz*, Intern. Kongr. f. Physiol. Boston 1929. — 13) *E. Waldschmidt-Leitz*, Die Enzyme. Braunschweig 1926. — 15) *R. Willstätter* u. *W. Grassmann*, ebendaselbst **138**, 184, 1924. — 16) *Vines*, Ann. of Bot. **17**, 606, 1903. — 17) *L. B. Mendel* u. *A. F. Blood*, Journ. of biol. Chem. **8**, 177, 1910. — 18) *E. Waldschmidt-Leitz*, *A. Schäffner*, *J. Bek* u. *E. Blum*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 17, 1930. — 19) *W. Grassmann* u. *H. Dykerhoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **175**, 18, 1928. — 21) *O. Ambros* u. *A. Harteneck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **181**, 24, 1928/29. — 22) *W. Grassmann* u. *A. Dykerhoff*, ebendaselbst **179**, 41. 1928. — 23) *W. Grassmann*, *Schönebeck* u. *Eibele*, ebendaselbst **194**, 124, 1931. — 24) *E. Waldschmidt-Leitz*, *A. Pull*, *A. K. Balls*, Naturw. **18**, 644, 1930. — 25) *W. Grassmann* u. *H. Dykerhoff* u. *Schönebeck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **186**, 183, 1930. — 26) *F. Demuth* u. *I. v. Riesen*, Klin. Wochenschr. **6**, 2099, 1927; diese Zeitschr. **203**, 22, 1928. — 27) *L. Néhmeth*, Arch. f. exper. Zellforsch. **8**, 177, 1929. *L. Karczag* u. *L. Néhmeth*, Klin. Wochenschr. **6**, 1091, 1927. — 28) *K. G. Stern*, ebendaselbst **9**, 1735, 1930. — 29) *L. Michaelis* u. *K. G. Stern*, im Druck, 1931. — 30) *X. Utkina-Ljubowzowa* u. *O. Steppuhn*, diese Zeitschr. **211**, 426, 1929; **220**, 41, 1930. — 31) *H. Kleinmann*, ebendaselbst **99**, 115, 1919; **137**, 144, 1923; in *Oppenheimer-Pincussen*, Die Fermente und ihre Wirkungen **3**, 60. — 32) *S. G. Hedin*, Journ. of biol. Chem. **54**, 190ff., 1922, und frühere Arbeiten. — 33) *P. Rona* u. *H. Kleinmann*, diese Zeitschr. **169**, 320, 1926; **150**, 144, 1924. — 34) *K. G. Stern*, ebendaselbst **236**, 464, 1931. — 35) *J. Pohl*, Abderhaldens Handb. Abt. I, Teil 8, 585, 1922. — 36) *Linderström-Lang*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **182**, 148; **188**, 48. — 37) *R. Willstätter* u. *K. Schneider*, ebendaselbst **133**, 193. — 38) *P. Rona*, *H. Kleinmann* u. *E. Dressler*, diese Zeitschr. **228**, 6, 1930. — 39) *P. Rona* u. *H. Kleinmann*, ebendaselbst **241**, Heft 4/6, 1931.

Lebenslauf.

Ich, Fritz Werr, wurde am 28. Juni 1903 als ältester Sohn des Ingenieurs Albin Werr und seiner Frau Käthe, geb. Plaug, zu Frankfurt/Oder geboren. Dort besuchte ich von 1909 bis 1917 das Reform-Realgymnasium und dann nach dem Tode meines Vaters und der Uebersiedlung nach Berlin die Kantschule (Oberrealschule) zu Berlin-Karlshorst, welche ich 1924 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Vom Sommersemester 1924 bis zum Wintersemester 1930/31 war ich auf der Philosophischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin immatrikuliert. Meine praktische chemische Ausbildung erhielt ich im Chemischen, Physikalischen und Physikalisch-Chemischen Institut sowie dem wissenschaftlichen Laboratorium von Herrn Professor A. Rosenheim. Meine Lehrer waren die Herren Professoren Schlenk, Paneth, Bodenstein, P. Pringsheim, Wehnelt, Rosenheim und Rona.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1930 bis zum Juni 1931 in der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität (Charité) unter der Oberleitung von Herrn Professor Dr. P. Rona und unter der direkten Leitung und auf Anregung von Herrn Privatdozenten Dr. Dr. H. Kleinmann ausgeführt, denen ich, wie allen, die mich hierbei unterstützten, an dieser Stelle verbindlichst danke.

Diese Arbeit erschien im gleichen Umfange in der Biochem.-Zeitschrift, Band 241.